УДК-57ю089:59
ББК 45.318:28.6я81

РУКОВОДСТВО ПО ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ И АЛЬТЕРНАТИВНЫМ МОДЕЛЯМ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЯХ

под редакцией: Н.Н.Каркищенко и С.В.Грачева

Первое российское руководство, содержащее гармонизированные с международными стандартами требования к использованию в неклинических исследованиях качественных животных и валидированных альтернативных моделей, соответствует принципам надлежащей лабораторной практики (GLP). В руководстве сформулированы основы биоэтики, категорирования, контроля качества, генетического и микробиологического мониторинга, технологий содержания лабораторных животных и биобезопасности при работе с ними. Приводятся программы обучения персонала. Даны принципы дизайна экспериментов, моделирования в экстремальных и хирургических биомедицинских технологиях, формирование стандартных операционных процедур, построения аллометрических соотношений человека, животных и альтернативных моделей, как основы унификации и экстраполяции результатов экспериментов в клинику. Основной целью руководства является экономия ресурсов и времени, исключения дублирования в достижении сопоставимого уровня качества исследований на уровне ведущих стран по стандартам GLP в России.

The first Russian Manual which contents harmonized with international standards requirements for using in non-clinic trials quality animals and valid alternative models corresponds to principles of Good Laboratory Practice (GLP). There are basis bioethics principles, categories, quality controls, genetics and microbiology monitoring, laboratory animals husbandry technologies and biosafety in this Manual. There are also studying programs for personal in this one. Principles of experimental design, modeling in extreme situations and surgery biomedical technologies, samples of Standard Operation Procedures, allometry correlations between humans, animals and alternative models as basis of experimental results unification and extrapolation in clinical trials. The aim of Manual is economy of resources and time, excluding duplication in achievement comparison quality researches international level under GLP standards in Russia.

Москва – 2010

Рецензенты:
директор НИИ фармакологии СО РАМН, академик РАМН **Дыгай Александр Михайлович**
директор НИИ медицинской приматологии РАМН, академик РАМН **Лапин Борис Аркадьевич**
директор Всероссийского НИИ ветеринарной санитарии, гигиены и экологии РАСХН, академик РАСХН **Смирнов Анатолий Михайлович**

Авторский коллектив:
Асташкин Евгений Иванович (д.б.н., профессор, зав.лабораторией экстремальных состояний ММА имени И.М.Сеченова МЗСР РФ)
Ачкасов Евгений Евгеньевич (д.м.н., профессор, зав.кафедрой лечебной физкультуры и спортивной медицины ММА имени И.М.Сеченова МЗСР РФ)
Афонин Константин Владимирович (директор филиала «Андреевка» Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Берзин Игорь Александрович (д.м.н., профессор, главный специалист-эксперт управления организации научных исследований ФМБА России)
Бескова Татьяна Борисовна (научный сотрудник Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Болотских Любовь Александровна (зав.лабораторией гнотобиотов Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Бояринцев Валерий Владимирович (д.м.н., профессор, зам.директора по науке НПЦ «Фармзащита» ФМБА России)
Васильев Андрей Никифорович (к.б.н., директор Института доклинической и клинической экспертизы лекарственных средств НЦ ЭСМП Росздравнадзора РФ)
Галахова Татьяна Валентиновна (научный сотрудник Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Грачев Сергей Витальевич (академик РАМН, академик-секретарь Отделения медико-биологических наук РАМН)
Деньгина Светлана Евгеньевна (научный сотрудник Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Жармухамедова Татьяна Юрьевна (к.б.н., старший научный сотрудник ИБХ имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН)
Капанадзе Гия Джемалиевич (к.с.-х.н., зав.лабораторией биомедицины Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Каркищенко Владислав Николаевич (д.м.н., профессор, зав. отделом фармакологии и токсикологии Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Каркищенко Николай Николаевич (академик РАРАН, член-корреспондент РАМН, зав.лабораторией биобезопасности, директор Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Касинская Наталья Владимировна (зав. лабораторией постгеномных технологий Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Кукес Владимир Григорьевич (академик РАМН, директор института Клинической фармакологии Росздравнадзора РФ)
Матвеенко Елена Леонидовна (к.э.н., доцент, Ученый секретарь Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Макляков Юрий Степанович (д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии Ростовского государственного медицинского университета МЗСР РФ)

Мурашов Александр Николаевич (д.б.н., профессор, зав. лабораторией биологических испытаний ИБХ имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН)
Муха Александр Владимирович (д.м.н., зав.лабораторией экспериментальной хирургии и мониторинга здоровья Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Назаров Виктор Борисович (д.м.н., директор НПЦ «Фармзащита» ФМБА России)
Нечипоренко Сергей Петрович (д.м.н., директор Института токсикологии ФМБА России)
Радилов Андрей Станиславович (д.м.н., профессор, зам.директора НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России)
Ревякин Артем Олегович (к.б.н., зав. лабораторией фармакомоделирования Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Рембовский Владимир Романович (д.м.н., профессор, директор НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России)
Решетов Игорь Владимирович (член-корреспондент РАМН, руководитель отделения микрохирургии Московского научно-исследовательского онкологического института имени П.А. Герцена МЗСР РФ)
Ржевский Дмитрий Иванович (к.б.н., старший научный сотрудник ИБХ имени академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН)
Самойлов Александр Сергеевич (к.м.н., начальник медико-биологического отдела НПЦ «Фармзащита» ФМБА России)
Сахаров Дмитрий Сергеевич (к.б.н., зав.лабораторией нанорегуляторных систем Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Семенов Хызыр Хыйсаевич (к.б.н., зав.лабораторией генетики Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Станкова Наталия Владимировна (к.б.н., научный сотрудник Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Степанова Ольга Ивановна (к.б.н., зав. лабораторией клеточных нанотехнологий Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Сычев Дмитрий Алексеевич (д.м.н., профессор кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ММА им.И.М. Сеченова, ведущий научный сотрудник НЦБМТ РАМН)
Титов Сергей Владиленович (директор филиала «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий РАМН)
Хоронько Владимир Владиленович (д.б.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии Ростовского государственного медицинского университета МЗСР РФ)
Ших Евгения Валерьевна (д.м.н., профессор, директор филиала «Клиническая фармакология» НЦБМТ РАМН)
Шумаков Дмитрий Валерьевич (член-корреспондент РАМН, руководитель отделения сердечной хирургии и вспомогательного кровообращения ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова МЗСР РФ)

Предисловие

Совершенствование и развитие биомедицинских технологий, возрастающие требования к контролю качества лекарств, БАДов, нутриентов, ужесточение гигиенических норм для химических, биологических и физических факторов, предъявляют новые требования к качеству и разнообразию лабораторных животных. Потребность в исследованиях на животных растет по мере разработки и внедрения инновационных средств и материалов на основе клеточных технологий, нанобиотехнологий и т.д. Новые вызовы времени неизбежно влекут новые предложения. Все громче звучат призывы замены лабораторных животных альтернативными моделями, вплоть до переживающих клеток, одноклеточных организмов, биохимических, квантово-механических конструкций. Частичное замещение животных альтернативными моделями или полное исключение животных из экспериментов — вот суть жесточайших, но, на наш взгляд, беспредметных дискуссий в околонаучной среде. Любой благоразумный исследователь согласится, что не только исключение, но и простое ограничение использования лабораторных животных высокого качества (SPF, гнотобиоты) и необходимого разнообразия (инбредные, гетерогенные, трансгенные, нокаутные) не просто затормозит, но и попросту остановит прогресс в познании живых систем. Это создаст угрозу для безопасности человечества в условиях агрессии биологических, химических и физических факторов, ограничит возможности человека влиять на материальный мир.

Если рассматривать человеческое сознание как некую субстанцию высокоорганизованной энергии, способной влиять на окружающий мир, то тело предстанет лишь в качестве сосуда для величайшего сокровища природы — разума. В историческом аспекте познание тела путем вивисекции оказалось более доступным занятием, чем познание разума. Так веками формировалась новая мораль, согласно которой ценность научной работы определялась числом вскрытых животных. Более того, это легко прикрывалось и обосновывалось чуть ли не необходимостью

жертвоприношения неким высшим силам природы. Но, воистину, чем весомее жертва, тем выше обретаемое могущество. Жрецы (и/или) экспериментаторы начинали с мелких тварей, а со временем жертвы обретали все больший размах, а сам процесс перемещался с околохрамовых площадей в лаборатории и университеты. Потребность в животных, приносимых на жертвенный алтарь науки, росла все быстрее, а характер экспериментов приобретал форму кровавых жертв по принципу: без крови жертва не имеет смысла, больше крови – ярче эксперимент.

Однако уже более 22 тысячелетий назад Корнелий Цельс в сочинении «De Medicine» указывал на неприемлемость для правильной оценки функций живого организма использования вивисекции и болезненных экспериментальных процедур. Но лишь с 1959 г., после выхода в свет книги У.Рассела и Р. Берча «The Principles of Humane Experimental Technique» в мир науки вошла концепция гуманного использования животных в экспериментах, или более кратко «Концепция 3R».

Наряду с принципами качественной экспериментальной практики, указанные авторы предложили новую терминологию *альтернативного моделирования*:

- ✓ *частичное замещение* – альтернативный метод частично исключает эксперимент на животных и требует дополнительной альтернативной методики без животных;
- ✓ *батарея тестов* – серия методов, выполненных в одно и то же время или в тесной связи друг с другом, для получения информации в рамках дополнительного многофакторного эксперимента;
- ✓ *стратегия последовательных тестов* – выбор каждого теста определяется достоверными результатами предыдущего уровня исследований, но построение осуществляется в виде последовательного процесса, состоящего из серии (батарей) тестов.

Эти и уже многие другие научные подходы, активно разрабатываемые в настоящее время, составляют методологическую и материальную основу как бурно развивающегося альтернативного моделирования, так и биоэтической концепции.

Биоэтические моменты в настоящем Руководстве проходят красной нитью по всем главам и разделам, начиная с выбора лабораторных животных и заканчивая их использованием в различных областях биомедицинских технологий. Это тем более существенно, что Руководство является первым в своем роде изданием в России, содержащим гармонизированные с международными стандартами требования, соответствующие принципам надлежащей лабораторной практики (GLP), по использованию качественных животных в исследовательских, обучающих и экспертных процедурах. Обучение персонала строится на общеприня-


ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО
ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 53434—2009

ПРИНЦИПЫ
НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2010

тых в мировом сообществе принципах категорирования в соответствии с директивами FELASA. Важнейшей проблемой взаимодействия человека с лабораторными животными, является биобезопасность при работе с ними, идентификация опасных факторов и оценка рисков, а также ответственность персонала. С марта 2010 г. в России введены в действие Принципы надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009), предусматривающие приведение всех доклинических, внеклинических и экспертных исследований в соответствие с международными стандартами GLP. Это в свою очередь предполагает унификацию дизайна экспериментов, гармонизацию получаемых результатов и их интерпретацию в рамках требований и стандартов ECVAM, FELASA, OECD, FDA, EPA и др. Это особенно важно в проведении международной кооперации по исследованию генетического полиморфизма человека и животных. В этих случаях, как и во многих других ситуациях, универсальным принципом межлабораторной и международной кооперации является использование стандартных операционных процедур (СОП) – документов, подробно описывающих процедуры манипуляций, которые, как правило, подробно не описываются в протоколах конкретных исследований.

Не упреждая изложения основных разделов Руководства, следует подчеркнуть такие направления, как *принципы проведения экспериментов* и *специальные биомедицинские исследования*, в которых наряду со специфическими методическими приемами большое внимание уделяется предупреждению и исключению боли и страданий животных, квалифицированной анестезии и анальгезии. В таком же подтексте изложены вопросы

моделирования состояний организма животных при *экстремальных воздействиях* и в процессе применения хирургических биомедицинских технологий.

Учитывая возрастающую потребность в лабораторных животных для исследования эффективности и безопасности лекарственных средств, в Руководстве в соответствии с современными требованиями GLP даны принципы, порядок и технологии проведения фармакологических и токсикологических испытаний на доклиническом этапе. Специально выделена глава, посвященная оценке противовирусных средств на лабораторных животных и альтернативных биомоделях. Это предопределено неожиданными вирусными атаками H1N1, H5N и др. возбудителей на человечество в виде ТОРС, птичьего, свиного гриппа и их комбинаций. На фоне этих «вирусных взрывов», как вызовов благополучию человечества, вырастают требования к оценке любых химических, биологических, наноинженерных конструкций в качестве возможных противовирусных агентов.

В Руководстве уделено большое внимание оценке биомедицинской безопасности, современным подходам к оценке токсичности на основе стандартизованных моделей, вопросам токсикогеномики, использованию альтернативных батарей тестов. Эти подходы достаточно широко пропагандируются за рубежом, но малоизвестны или малоприменимы в нашей стране. Важным аспектом является повсеместное внедрение новых стратегий сочетания животных и альтернативных моделей в фармакологии, токсикологии, гигиене, экологии и в специальных прикладных исследованиях.

Сравнительные измерения разных видов живых организмов по каким-то общим признакам позволяют установить сходства морфофункциональных и иных характеристик в целях экстраполяции новых данных в отношении человека. Эти измерения укладываются в понятия аллометрии и дают ключ к интеграции результатов, полученных на альтернативных и животных моделях. Аллометрические уравнения являются выражением регрессии, которое описывает вариацию одного параметра в зависимости от другого (масса и поверхность тела, уровни подобия, кинетика процессов, релевантность и т.д.). В свою очередь это открывает путь к аналитико-синтетическим процессам в познании живых систем. Основной задачей и целью Руководства является стремление к экономии ресурсов и времени, отводимых на эксперимент, исключение дублирования и достижение сопоставимого качества исследований и взаимоприемлемых экспертных оценок на уровне ведущих стран по стандартам GLP в России.

Глава 1

Основы создания Руководства

Эксперимент с использованием лабораторных животных и других живых объектов является одним из ведущих методов познания в современной медицине, фармакологии, ветеринарии, биологии. Качество лабораторных животных во многом определяет результат эксперимента. Постоянно возрастают требования к качеству лабораторных животных. Поэтому важнейшей задачей лабораторного животноводства является организация их производства и содержания, обеспечивающих необходимое качество и стандартность животных. Проведение экспериментов на живых объектах должно обеспечивать эффективное использование животных в научных целях, уменьшение их количества, соблюдение принципов гуманного обращения. Данное Руководство подготовлено специалистами в области науки о лабораторных животных, имеющих большой опыт работы как в области разведения и содержания лабораторных животных, так и в проведении экспериментальной работы, и рассчитано как руководящий рекомендательный документ по проведению контролируемых исследований и биомоделирования на живых объектах.

Необходимость гармонизации отечественных норм и правил проведения доклинических исследований с международными документами требует стандартизации методических подходов и принципов, включая использование альтернативных моделей. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP) являются важнейшей интегральной системой для сопоставимости результатов оценки качества получаемых в разных отечественных и зарубежных учреждениях данных. Поскольку в нашей стране такое руководство для исследователей отсутствует, коллектив авторов взял на себя труд подготовить его первую версию, имеющую цель определенной унификации требований по проведению доклинических исследований.

Современная нормативная база по проведению доклинических исследований на лабораторных животных более или менее полно отражена в документах международных организаций, законах и подзаконных актах отдельных зарубежных стран. В Российской Федерации она находится на начальном этапе. Поэтому необходимо руководствоваться существующими стандартами и требованиями доклинического тестирования как национального, так и международного уровня. В настоящее время в Российской Федерации завершается подготовка нового закона о лекарственных средствах. До его принятия можно руководствоваться существующим «Законом о лекарственных средствах» от 22 июня 1998 г. № 86-ФЗ, принятым Государственной Думой 5 июня 1998 г. и одобренным Советом Федерации 10 июня 1998 г. (статья 8, пункт 1), и другими отечественными и зарубежными документами:

- ✓ Правилами лабораторной практики, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 г.;
- ✓ Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2005 г.;
- ✓ Документами OECD по гармонизированным принципам Надлежащей лабораторной практики («Principles of Good Laboratory Practice») с внесенными изменениями от 1997 г., инкорпорированные в Директиву ЕС 2004/10/ЕС.
- ✓ Кодексом федеральных регламентов FDA (Code of Federal Regulations, CFR), 1979 г.

А также разделом 21 в работе «Продукты питания и лекарственные средства» («Food and Drugs») и главой 58 «Надлежащая лабораторная практика для доклинических лабораторных исследований» («Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies»).

Предпосылки создания Руководства

Основные биомедицинские исследования отражают использование фундаментальных научных принципов в медицинских и биологических исследованиях, направленных на развитие средств для определения, предупреждения или изучения болезней человека. Биомедицинские исследования являются основой на стадиях разработки и исследования новых и производства полученных лекарств. Биомедицинские исследования должны соответствовать не только национальным или международным соглашениям и руководствам, но и требованиям надлежащей лабораторной практики (GLP).

Настоящее Руководство предназначено отнюдь не только научным сотрудникам в области биомоделирования, а организации и планированию всей работы в целом. В качестве примера на рис. 1 (основные этапы фармакотоксикологических исследований в пространстве биомедицины).показан весь процесс организации и планирования научно-исследовательской деятельности и выделены основные этапы фармакотоксикологических исследований в пространстве биомедицины.

Основные этапы включают поисковые или исследовательские методы, которые имеют свои фазы разработки лекарств или программ для контроля за развитием болезней. Этапы разработки можно представить в виде следующей триады:

- ✓ доклиническая стадия для определения безопасности и потенциальной эффективности лекарства;
- ✓ клиническая стадия для установления безопасности и эффективности лекарства для человека;
- ✓ постклиническая стадия, когда лекарство мониторируется на его безопасность и его производство и реализация тщательно контролируются с использованием неклинических исследований.

Основным отличием системных биомедицинских исследований от традиционной схемы разработки лекарств является то, что в них обязательно присутствуют наряду с лабораторными животными и альтернативные биомодели. Исследования проводятся на клеточных материалах, тканях, органах и организме в целом.



Рис. 1. Основные этапы фармакотоксикологических исследований в пространстве биомедицины

Результативность биомедицинского эксперимента с использованием лабораторных животных в существенной степени зависит от их качества. С развитием науки требования к качеству и разнообразию лабораторных животных постоянно возрастают.

Создание настоящего Руководства предопределено всем ходом развития лабораторного животноводства и экспериментального биомоделирования в нашей стране и за рубежом. В развитых зарубежных странах наука о лабораторных животных существует уже несколько десятилетий. Специалисты данной области объединены в различные ассоциации с целью обмена полученными знаниями путем их публикаций в специализированных научных изданиях, проведении научных и научно-практических конференций, симпозиумов. В настоящее время, несмотря на широкое развитие различных методов моделирования, не найдено адекватных альтернативных способов замены лабораторных животных, полностью соответствующих требованиям экспериментальной работы.

Разведение лабораторных животных в России началось в первой половине прошлого столетия. Первые виварии были созданы в Институтах тропической медицины (Москва), эпидемиологии и микробиологии (Москва), экспериментальной медицины (Санкт-Петербург). В начале 1930-х гг. появились первые промышленные питомники, и, в частности, при Институте экспериментальной медицины. В то же время определенно выделяется тенденция совершенствования работы с лабораторными животными, встает вопрос о подготовке специальных кадров. Об этом свидетельствует создание курсов повышения квалификации сотрудников институтов Наркомздрава по лабораторному животноводству, на которых предусматривалось обучение специалистов для работы в питомниках иавивариях. Сохранилась программа курсов, которая была составлена в 1934 г. профессором П.П. Сахаровым и рецензировалась Институтом эпидемиологии и микробиологии Наркомздрава. Содержание программы отражало уровень развития лабораторного животноводства тех лет.

Вопросы, рассматривавшиеся на курсах, существенно отличались от современных. Много внимания уделялось инфекционным заболеваниям лабораторных животных, санитарно-гигиеническим мероприятиям. Отсутствовали понятия стандартизации лабораторных животных, контролируемой и специализированной среды содержания, не было упоминания об инбредных животных. Однако сам факт существования таких курсов свидетельствует о понимании учеными того периода важности грамотной работы с лабораторными животными в лабораториях и питомниках.

В послевоенные годы лабораторное животноводство в основном развивается в системе Министерства здравоохранения СССР и Академии медицинских наук СССР. В 1950-е гг. возникают довольно крупные специализированные питомники по производству лабораторных животных при Всесоюзном институте экспериментальной медицины (Москва), Институте вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова (Москва), Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи (Москва). Ряд небольших питомников объединяются в более крупные. Так в 1959 г. в рамках АМН СССР на базе четырех хозяйств возник питомник лабораторных животных «Центральный». Возникают научные лаборатории по селекции и экологии, охране здоровья лабораторных животных. В 1955 г. в Институте экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР (Москва) создается лаборатория генетики и кормления лабораторных животных. Одновременно в Ленинграде в Институте экспериментальной медицины АМН СССР начинает работать группа по изучению инфекционной и инвазионной патологии лабораторных животных.

С августа 1927 г. по решению Правительства СССР в Сухуми действует питомник обезьян. Впоследствии питомник был преобразован в Субтропический филиал ВИЭМ и с 1944 г. работает как самостоятельное учреждение – медико-биологическая станция в составе создававшейся в то время Академии медицинских наук СССР (МБС АМН СССР). Задачей станции было предоставление возможности ученым из различных учреждений Академии и Минздрава работать на приматах – «лабораторных двойниках» человека. С течением времени она была реорганизована в Научно-исследовательский институт Экспериментальной Патологии и терапии АМН СССР (НИИ ЭПиТ АМН СССР). В 80-х гг. в Институте было создано 2 производственных питомника и 2 лесных заказника, где животные находились на свободе. Общее количество обезьян разных видов (павианы 2-х видов, макаки 4-х видов, зеленые мартышки, гелады, мандрилы и др.) достигло 7 тыс. животных.

Известные русские ученые, их сотрудники и ученики, работавшие в Институте в разные периоды времени, оказывали значительное влияние на направление исследований и задачи Института. С момента основания питомника (приматологического центра в Сухуми) Институт возглавляли видные биологи и медики, а с 1958 г. по настоящее время бессменным директором ИЭПиТ АМН СССР, а затем Учреждения Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский Институт медицинской приматологии (НИИ МП РАМН) является академик РАМН, Международной академии астронавтики, доктор медицинских наук, профессор Лапин Борис Аркадьевич. В настоящее время Б.А. Лапин возглавляет Научно-исследовательский Институт медицинской приматологии РАМН в г. Адлер.

Наряду с этим развивается и другое направление лабораторного животноводства. 12 июня 1929 г. Постановлением ЦИК и СНК СССР был

организован питомник лабораторных животных (станция Столбовая Московской области) как экспериментальная база Института вирусологии Наркомздрава для разведения животных генетически чистых линий с целью изучения ультравирусов. С 1957 г. на этой базе функционировал питомник по разведению новых линий инбредных животных. В 1959 г. создан Центральный питомник лабораторных животных АМН СССР.

В 1961 г. Постановлением Президиума АМН СССР № 114 от 30 августа хозяйство экспериментально-сывороточного производства «Светлые горы», производственного отдела Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР передается питомнику лабораторных животных «Центральный». В питомнике разместили Лабораторию экспериментальных животных Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР и группу по изучению инфекционной и инвазионной патологии лабораторных животных Института экспериментальной медицины АМН СССР. В дальнейшем эти лаборатории были присоединены к Институту нормальной и патологической физиологии АМН СССР. Руководителем Лаборатории был назначен В.А. Душкин, возглавлявший ее на протяжении более 20 лет.

Вновь созданная Лаборатория экспериментальных животных сосредотачивается на выполнении научной работы по изучению лабораторных животных как объектов эксперимента и по организации их разведения. В это время увеличивается количество институтов, использующих лабораторных животных, выращенных в питомниках АМН СССР.

Практические задачи методического руководства питомниками и вивариями институтов требовали все более интенсивной работы Лаборатории экспериментальных животных. В 1967 г. Лаборатория экспериментальных животных получила статус самостоятельного учреждения (Постановление Президиума АМН СССР № 176 от 19.07.1967 г.) и была переименована в Научно-исследовательскую лабораторию экспериментально-биологических моделей АМН СССР (НИЛЭБМ АМН СССР). Перед Лабораторией были поставлены следующие основные задачи:

- ✓ генетический контроль лабораторных животных, ведение и контроль коллекционного фонда инбредных линий, получение и внедрение в эксперименты новых инбредных и мутантных линий животных и их гибридов;
- ✓ контроль здоровья лабораторных животных, разработка методов диагностики и средств профилактики инфекционных и инвазионных заболеваний экспериментальных животных;
- ✓ разработка полнорационных и экономически выгодных норм кормления, а также гигиенических норм обслуживания лабораторных животных;

- ✓ разработка, получение и внедрение в эксперименты гнотобиотов (безмикробных животных);
- ✓ информирование экспериментаторов об источниках генетически контролируемых линий лабораторных животных, имеющихся в СССР и за рубежом;
- ✓ международные связи с зарубежными центрами аналогичного профиля и международными организациями по лабораторному животноводству (Международным комитетом по лабораторным животным при ЮНЕСКО).

В этом и некоторых других научных центрах ведется работа по изучению инбредных животных. Так, с 1947 г. в Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова создается отечественная линия крыс с высокой судорожной активностью – крысы Крушинского-Молодкиной. В Институте эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи открывается лаборатория инбредных животных. В питомнике АМН СССР «Столбовая» начинается промышленное разведение инбредных мышей. Постановлением Совета Министров СССР в г. Электрогорске Московской области создается специализированный питомник лабораторных животных.

Таким образом, в СССР появились специализированные учреждения, которые концентрировали исследовательскую и методическую работу по лабораторному животноводству. Уже с 1969 г. утверждается общесоюзное направление исследований «Биология и патология лабораторных животных» в рамках Научного совета АМН СССР по общей патологии.

Активно разрабатываются методы генетического контроля и обеспечивается генетическая стандартность животных питомников АМН СССР. Оказывается методическая помощь по этим вопросам заинтересованным учреждениям. Питомники и институты получают необходимые племенные ядра мышей инбредных линий. В 1970-е гг. в НИЛЭБМ АМН СССР создается ферма мини-свиней, одновременно начинается работа по выведению линий кур, высокочувствительных и устойчивых к вирусам лейкоза. Разрабатывается система мониторинга здоровья лабораторных животных в питомниках, отрабатываются методы микробиологического, вирусологического, паразитологического контроля. Создаются рецептуры и промышленное производство брикетированных кормов для лабораторных животных. В НИЛЭБМ АМН СССР – одном из первых специализированных учреждений СССР, занимающимся лабораторным животноводством, – начались работы по гнотобиологии, освоены методы получения безмикробных животных для экспериментальной работы.

НИЛЭБМ и питомники лабораторных животных были реорганизованы в 2002 г. в Научный центр биомедицинских технологий РАМН (Центр), который возглавил академик РАРАН и Международной академии астронавтики, член-корреспондент РАМН, лауреат Государственных премий СССР и премий Правительства РФ, доктор медицинских наук, профессор Каркищенко Николай Николаевич. Научные задачи Центра значительно расширились, больше внимания стало уделяться научно-исследовательской работе. Центр осуществляет свою деятельность в соответствии с утвержденными Президентом РФ критическими технологиями: «Биомедицинские и ветеринарные технологии жизнеобеспечения и защиты человека и животных», «Клеточные технологии», «Нанотехнологии и наноматериалы» и приоритетными направлениями развития науки, технологий и техники РФ: «Безопасность и противодействие терроризму», «Живые системы».

Центр работает по приоритетным направлениям, утвержденным Бюро ОМБН РАМН (Протокол № 7 от 27.10.2009 г.), включая «Медико-биологические аспекты биобезопасности».

Основными направлениями научных исследований НЦБМТ РАМН являются: создание научно-методологических основ и биологических моделей для обеспечения фундаментальных медико-биологических исследований, сертификации, контроля качества и оценки безопасности препаратов для человека, сохранения генетических ресурсов лабораторных животных, репродукции тканей и биопротезирования; научно-исследовательские разработки по биомедицинским технологиям, нанобиотехнологиям для обеспечения биобезопасности и противодействия терроризму; разработка фундаментальных аспектов биомедицинских технологий клеточно-тканевой и молекулярной медицины с использованием стволовых и прогениторных клеток; разработка новых медицинских технологий, методов фармакогеномики и биоэквивалентности для повышения эффективности и безопасности фармакотерапии, осуществление высокотехнологичной медицинской деятельности.

Одной из основных задач деятельности Центра является создание условий обязательного соблюдения требований нормативных актов в отношении обеспечения безопасности здоровья людей при применении биомедицинских технологий в медицинской практике.

Однако вопросы сохранения коллекционного фонда, выведения новых линий лабораторных животных постоянно находятся в фокусе внимания.

В Центре постоянно, начиная с первых дней существования НИЛЭБМ АМН СССР, проводится учебно-методическая работа. Начиная с 1970 г. проводятся семинары по научным и практическим вопросам лабораторного животноводства, с 2006 г. проводится ежегодная научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование», в 2008 г. в Центре был открыт филиал кафедры зоологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

По инициативе НЦБМТ РАМН сформирован Научный совет по биомедицинской безопасности РФ для комплексной координации исследований, проводимых учреждениями РАМН, Минздравсоцразвития и других ведомств, занимающихся проблемами нанотехнологий, стволовых клеток, изучением безопасности лекарственных средств в Российской Федерации. Головной организацией, координирующей исследования в указанных направлениях, является Научный центр биомедицинских технологий, а председателем Совета – директор НЦБМТ РАМН, академик РАРАН, член-корреспондент РАМН Н.Н.Каркищенко. Он также возглавляет Специальную фармакологическую комиссию Росздравнадзора РФ. Важная роль во внедрении принципов GLP в практику экспериментальной работы принадлежит Российской Ассоциации организаций по контролю за проведением исследований на лабораторных животных.

Базовые элементы, цели и задачи Руководства

За последнее время наблюдается существенный рост экспериментальных процедур, проводимых на животных. Наиболее часто используются в экспериментальной практике мыши (66%), рыбы (17%), крысы (10%) и птицы (3%), также экспериментаторы работают на кроликах, собаках, птицах, рептилиях и земноводных. Что особенно характерно для последнего десятилетия – это рост использования приматов после весьма существенного снижения в предыдущие годы. Количество процедур с использованием макак возросло почти на 25%. Этот рост связан с тем, что эти обезьяны широко используются для тестирования безопасности и эффективности новых фармацевтических средств. Ученые и представители промышленности предсказывают в обозримом будущем дальнейший рост использования макак ввиду роста биологических испытаний различных фармакологических средств. Они аргументируют это тем, что специфика человеческого организма требует использования именно этих обезьян как наиболее близких человеку, хотя имеются данные, которые доказывают и обратный эффект. Развитие альтернативных систем моделирования, основанных на использовании клеток человека, компьютерное моделирование, улучшение дизайна клинических испытаний может помочь в решении данной проблемы. Фонд замены животных в меди-

цинских экспериментах (Fund for Replacement of Animals in Medical Experiments – FRAME) призывает исследователей сконцентрироваться на дизайне и валидации таких альтернатив, чтобы избежать использования приматов в качестве моделей.

Генетически модифицированные и измененные (имеющие вредные генетические дефекты) животные также были включены в большое количество экспериментов. Наиболее часто генетически изменяют мышей, но и другие виды лабораторных животных подвержены таким процедурам. В фундаментальных исследованиях наблюдается тенденция к снижению использования генетически измененных крупных животных. Однако, если сохранится рост в использовании рыб и продолжатся крупномасштабные программы по созданию фондов линий генетически измененных крыс, то эта тенденция может измениться на возрастание.

Количество использованных в экспериментах рыб в 2008 г. увеличилось в 5 раз по сравнению с уровнем 10-летней давности. Основные процедуры (40%) – это фундаментальные исследования в таких областях как физиология, анатомия и фармацевтические эксперименты. Уровень прикладных экспериментов вырос в 3 раза. Рыбы используются в различных процедурах по определению токсичности, тестах по определению безопасности и эффективности фармакологических средств, изучению токсичности и загрязнения окружающей среды.

Роль рыб в научных экспериментах возрастает экспоненциально, аналогично использованию генетически измененных мышей. Открытие новых способов использования этих животных приводит к увеличению тренда. Были получены данные, что в тестах на канцерогенез форель является более чувствительной моделью, чем грызуны. В научных экспериментах кроме форели используют и другие виды рыб, такие как зебрафиш и лосось.

Ежегодно по предварительным оценкам в ЕС от нежелательных последствий при приеме лекарств умирают 197 тыс. чел., потери составляют 79 млрд евро. В свете множества ошибок в оценке безопасности лекарств, тесты по проверке безопасности лекарств на животных являются лучшим способом оценки новых препаратов. Принятый Билль безопасности лекарств (The Safety of Medicines Evaluation Bill, 2009) требует прямого сравнения безопасности лекарств в тестах на животных с батареями тестов, основанных на биологических основах человека. В настоящее время не существует технологий, способных заменить тесты на животных.

Перечисленные данные диктуют необходимость правового регулирования вопросов, касающихся использования животных в различных научных и учебных целях. Успехи биологии, медицины, фармакологии, биомедицины во многом определяются возможностью выбора адекватной биологической модели для проведения эксперимента. Успехи генетики позволяют получать новые линии лабораторных животных, полностью отвечающих требованиям конкретного исследования. Однако остаются вопросы биоэтики, которые необходимо юридически урегулировать и неукоснительно соблюдать.

Во многих странах существуют как законы, так и подзаконные акты, регулирующие биомедицинские исследования, проводимые в научно-исследовательских учреждениях. В США и Европе законодательная база в области лабораторного животноводства развивается с 1960-х гг. Существуют многочисленные национальные и международные организации, регламентирующие экспериментальную работу с использованием лабораторных животных и развивающих альтернативные методы биомоделирования.

В Российской Федерации в настоящее время нет закона, определяющего порядок проведения экспериментальной работы в учебных и научных целях с использованием лабораторных животных. Попытки принять Федеральный закон о защите животных от жестокого обращения не увенчались успехом. Закон был внесен на рассмотрение в Государственную Думу в июне 1998 г., прошел три чтения, получил огромное количество замечаний и поправок, а в итоге был отклонен Президентом РФ. После этого в феврале 2000 г. была создана согласительная комиссия, которая до настоящего времени не пришла к окончательному решению по данному законодательному акту.

В рамках Российской академии медицинских наук и Министерства здравоохранения РФ в апреле 2003 г. было разработано и принято Положение о контроле качества лабораторных животных, питомников и экспериментально-биологических клиник (вивариев). В соответствии с этим Положением были определены правила использования лабораторных животных контролируемого качества для биомедицинских исследований с целью проведения доклинических исследований лекарственных средств и получения научно обоснованных оценок безопасности лекарственных средств, пищевых продуктов, косметических средств.

В соответствии с этим Положением был определен порядок добровольной сертификации лабораторных животных для использования их в экспериментах. Сертификат выдает Научный центр биомедицинских технологий РАМН на основе анализа результатов регулярных обследований животных контрольно-диагностическими лабораториями питомников, ЭБК (вивариев), выборочных исследований, осуществляемых непосредственно в Центре. Для реализации данного Положения коллективом сотрудников Центра было разработано и опубликовано Руководство по содержанию и разведению лабораторных животных в питомниках и экс-

периментально-биологических клиниках (builder вивариях) и их использованию в научных, учебных и производственных целях.

Вопросы, касающиеся проведения ветеринарного надзора, регламентируются в ФЗ РФ «О ветеринарии» № 4979-1 от 14.05.1993 г.

Существуют правила безопасности, производственной санитарии, охранно-карантинного и ветеринарно-санитарного режимов на предприятиях биологической промышленности, утвержденные руководителем департамента ветеринарии Минсельхозпрода России, Главным Государственным ветеринарным инспектором 7 июня 1999 г.

Приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 года «Об утверждении правил лабораторной практики» даны определение и методология применения Стандартных операционных процедур (СОП). В то же время российские GLP не гармонизированы с соответствующими международными принципами, разработанными Организацией экономического сотрудничества и развития (ОЭСР или OECD), т.е. существующие на данный момент российские СОПы должны быть приведены в соответсвие с международными стандартами. С марта 2010 г. в силу вступил национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», полностью аутентичный принципам GLP/OECD. Следует отметить, что в результате многолетнего опыта работы НЦБМТ РАМН и ряда учреждений РАН уже наработаны основные пакеты СОПов и существует база для подготовки новых. Тем не менее, СОПы и иные нормативные документы, используемые в Российской Федерации, должны соответствовать стандартам, предлагаемым OECD, Международным инженерным консорциумом (IEC), Международной организацией по стандартизации (ISO), Комитетом по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), для того, чтобы результаты этих исследований адекватно воспринимались международными организациями.

В соответствии с вышеизложенными позициями данное Руководство направлено на обеспечение:

- ✓ проведения контролируемых исследований на лабораторных животных и альтернативных моделях;
- ✓ получения достоверных и воспроизводимых экспериментальных данных в опытах с использованием лабораторных животных;
- ✓ нормального физиологического развития лабораторных животных и состояния их здоровья;
- ✓ стандартности лабораторных животных по генетическим параметрам и условиям содержания;
- ✓ стандартных условий содержания лабораторных животных при их воспроизводстве в питомниках и проведении экспериментов в экспериментально-биологических клиниках (вивариях), включая соответствия этих условий требованиям надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice – GLP);
- ✓ унификации требований к профессиональной подготовке кадров специалистов по работе с лабораторными животными;
- ✓ унификации требований к ведению необходимой документации по содержанию лабораторных животных при их воспроизводстве и использованию в экспериментальных исследованиях и других видах деятельности;
- ✓ безопасности работы с лабораторными животными;
- ✓ уменьшения количества лабораторных животных, используемых в экспериментах;
- ✓ соблюдения принципа гуманного отношения к лабораторным животным;
- ✓ охраны окружающей среды;
- ✓ основы для введения государственного контроля за содержанием лабораторных животных при их воспроизводстве и использовании в экспериментальных исследованиях и других видах деятельности.

Важным элементом создания полноценной базы для проведения доклинических исследований, включая традиционные и наноинженерные вещества и материалы, их токсикологическую экспертизу и оценку безопасности, является международная аккредитация российских учреждений и лабораторий со стороны Ассоциации оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных (AAALAC).

Нанобиотехнологии и новые инициативы биомоделирования

Наночастицы с размерностью 1—100 нм имеют уникальные физико-химические параметры, механизмы и точки биомедицинского приложения. Это связано с нахождением большинства атомов на межфазной, внешней поверхности частиц, что в свою очередь обуславливает новые для медиков и биологов *квантово-механические* закономерности их действия. Иные электромагнитные, спектральные, физико-химические, биологические механизмы проявляются в уникальности мембранопроницаемости, антимикробного действия, влияния на регуляторный аппарат живых клеток, в том числе генный, в наличии особой механической прочности наноструктур и т.д. Развитие нанотехнологий и создание новых наноматериалов, обеспечивая научно-технический прогресс будущего, в то же время создает зону риска для человека и окружающей его среды.

Безопасность наноматериалов и нанотехнологий является важнейшим фактором, регламентирующим промышленное производство и внедрение в здравоохранение нанопродуктов. Для абсолютного большинства наноматериалов не известны механизмы поступления в организм, биосовместимости, биотрансформации, транслокации в органах и тканях, элиминации и, что особенно важно, их токсичности. В России, США, странах Евросоюза, Канаде, Японии, Китае и других странах ведутся обширные исследования по оценке безопасности и потенциальных рисков, связанных с производимыми наноматериалами. В России разработаны и в 2007 г. утверждены Постановлением Госсанэпиднадзора «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» и Приказом Роспотребнадзора – методические рекомендации «Оценка безопасности наноматериалов» [http://stroy.dbases.ru/Data1/52/52003/index.htm].

В тестах для наночастиц необходимо особое внимание уделить характеристике состоящих из них наноматериалов. При оценке нанобезопасности полученных инженерными способами наноматериалов, таких как фуллерены, одно- и многослойные углеродные трубки, оксиды металлов наноразмеров, такие как TiO_2, частицы с диаметром в нанометр низкой растворимости, считающихся наноматериалами, должны быть найдены принципиально новые процедуры изучения токсичности и точек окончания эксперимента при *ингаляционном*, *пероральном* и *трансдермальном* путях проникновения наночастиц.

Учитывая особенности поступления наночастиц в организм человека и животных, основными органами-мишенями являются ткани *дыхательной*, *интестициальной*, *иммунной*, *кожной* систем, а критичными по последствиям действия наноматериалов являются *головной мозг*, *костный мозг*, *репродуктивные* и *выделительные* органы. Отсутствие единой шкалы приоритетов для оценки безопасности всего многообразия наноматериалов и низкая информативность, а зачастую неприменимость традиционных токсико-гигиенических характеристик к наноразмерным структурам, делает необходимым поиск и использование новых биомедицинских подходов к их оценке.

Можно полагать, что *мишенями* для наночастиц, в том числе углеродных, являются биологические макромолекулы (ДНК, РНК, белки), биологические мембраны, в том числе гистогематические (ГГБ), гематоэнцефалические (ГЭБ) барьеры, системы окисления – восстановления, в том числе перекисного.

Естественно, что в тестах на оценку токсичности наноматериалов применительно к человеку и окружающей среде пока использовали лишь общие подходы. Необходимы новые оценки потенциальной токсичности ингаляций, оральной и кожной токсичности таких наноматериалов, как углеродные частицы, двуокись кремния, фуллерены, оксид магния, оксид цинка и диоксид титана. Диоксид титана используется в 70% мирового производства красителей и косметики. В то же время он классифицирован Международным Агентством по изучению рака как возможный канцероген человека.

Необходимо развитие и поиск альтернативных моделей на основе методов оценки физико-химических, протеиновых и иммунных процессов. Новые биомедицинские инициативы позволяют найти оптимальные подходы к оценке эффективности и безопасности наноматериалов.

Один из таких подходов включает короткие по продолжительности тесты с использованием нескольких биомаркеров для выявления определенного вида нанотоксичности. Эти эксперименты имеют высокую норму сигнал/шум и хорошую повторяемость. Если механизм нанотоксичности понятен, то его легко повторить в тестах *in vitro*.

При правильном подходе опыты *in vitro* позволяют получить информацию об уровне токсичности и ее клеточных и молекулярных механизмах. Токсикокинетические данные *in vitro позволяют оценить потенциальные дозы и характер действия* наночастиц для последующего исследования на лабораторных животных. Но только токсикологические эксперименты на животных дают достоверную информацию относительно опасности наноматериалов для человека. Поэтому единственным решением остается использование классического подхода в исследовании наноматериалов, где ключевыми объектами исследования остаются разные виды животных.

Современное состояние науки по использованию альтернативных подходов *in vitro* не позволяет ответить на вопрос о системном действии наночастиц на организм человека. Главными недостатками экспериментов *in vitro* являются недостаточная валидация полученных результатов в сравнении с экспериментами на животных и невозможность моделирования сложных биологических процессов, например полного воспалительного ответа.

Анализ литературы и собственные исследования в НЦБМТ показали, что при оценке наночастиц и наноматериалов оправданно использование *нового теста* на 28-дневную токсичность, который включает 4 уровня доз, на крысах обоего пола в количестве 10 аутбредных голов в каждой группе, всего – 80 голов, например WAG или Wistar. Для минимизации использования животных в эксперимент включают 3–5 линий крыс (например, линии WAG/GY, F344/Y, BK/Y, AUG/LacY, LEW/Y, созданные или поддерживаемые в нашем Центре) по 3 головы от каждой линии вместо 10 голов WAG. Этот эксперимент будет включать: 4 уровня

доз, животных двух полов, линии и 3 крысы в каждой группе, всего – 72 крысы.

Эксперимент, поставленный на нескольких линиях, часто показывает различную восприимчивость линий. Оценка нанобезопасности должна основываться на самой чувствительной линии, но в ряде случаев необходимо найти *ген* такой *восприимчивости*. Это поможет уяснить механизм нанотоксичности и получить данные для инновационных лекарств в будущем. К сожалению, токсикологи никогда не делали попыток использовать такой дизайн.

Если вместо крыс использовать мышей, то понадобятся более радикальные изменения. По зарубежным данным, именно мыши (91,4%) были наиболее часто используемым видом для генных модификаций, а лишь затем – крысы (3,6%), зебрафиши (2,3%), свиньи (1,4%) и другие виды, включая цыплят, овец и коров (1,3%). Наиболее часто использовались для генных модификаций мыши линий C57BL/6 (48,1%), 129Sv (11,1%), Balb/c (4,3%), CD1 (2,5%) и FVB (0,3%). Преимущество в использовании мышей заключается в широкой доступности различных линий и обширной базы данных по генетике мыши, соответствие генов мыши/человека, и относительная простота генетических манипуляций с мышью. Генетические модификации могут включать «вставку» необходимого гена, дающего отклик на нановещества.

Глава 2

Биоэтика, животные-модели, модели животных и альтернативное моделирование

Гуманное обращение с лабораторными животными является обязательным этическим долгом каждого человека, работающего с ними. В мировой практике гуманное обращение с лабораторными животными закреплено законодательными актами.

Биоэтика – это философски-прикладная область знания, охватывающая моральные, юридические и социальные проблемы, такие как отношение человека к диким и домашним животным, а также проблемы, возникшие в связи с бурным развитием биотехнологии и биомедицинских исследований.

Впервые термин «биоэтика» в 1971 г. ввел Р.В. Поттер. Некоторые национальные и европейские законодательства, регулирующие проведение экспериментов на животных, требуют замены животных альтернативными методами всегда, когда это только возможно.

В 1865 г. было создано Российское общество покровительства животным, деятельностью которого прежде всего является борьба с людскими жестокостями над животными. Идея защиты животных и природы на законодательном уровне появилась в Великобритании, где в 1926 г. было основано Общество по охране животных Лондонского университета (с 1938 г. – Университетская федерация защиты животных, UFAW). Эта организация сыграла и играет важнейшую роль в развитии этических концепций экспериментирования на животных и в становлении практических направлений, улучшающих эксперименты на животных. Группа исследователей во главе с М. Хьюмом, созданная в рамках актива UFAW, предприняла попытку разработать принципы гуманной экспериментальной техники.

В 1982 г. Генеральной Ассамблеей ООН принята Всемирная хартия природы, а в 2000 г. принята Декларация земли — первый международный документ, на основании которых всем формам жизни обеспечивается существование.

Биоэтические нормы и принципы трех R

Практически единственным методом контроля и экспертизы лекарств, а также изучения биологических реакций на воздействие экстремальных факторов являются экспериментальные исследования только на животных. Наиболее общие принципы, которыми необходимо руководствоваться при проведении контролируемых исследований на живых объектах, следующие:

- ✓ убедительные основания в необходимости планируемых экспериментальных исследований и невозможности замены животного какой-либо моделью или альтернативным объектом исследования;
- ✓ минимизация количества привлекаемых к исследованию животных за счет стандартизации условий эксперимента, повышения информативности методических приемов, исключения факторов, увеличивающих разброс экспериментальных данных;
- ✓ принятие необходимых мер, исключающих страдания животных;
- ✓ обязательное обеспечение надлежащего ухода за животными с учетом особенностей их этологии;
- ✓ гуманное отношение к животным (студенческая лабораторная работа, учебно-научный эксперимент, тестирование лекарственного препарата и др.).

Право на использование животных в экспериментах имеют высшие учебные, научно-исследовательские и лечебные учреждения, у которых есть специальные лаборатории.

Экспериментальную работу с животными могут проводить только те специалисты, у которых есть разрешение руководства госучреждения, имеющего лицензию на проведение исследовательских работ с использованием животных. Кроме того, эти специалисты несут ответственность за соблюдение правил содержания и использования животных. Исследователи, проводящие эксперименты, и вспомогательный персонал должны иметь достаточный опыт. Сотрудники экспериментальной лаборатории, имеющие среднее медицинское, ветеринарное или зоотехническое образование, аспиранты и студенты должны быть ознакомлены с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных за № 755 от 12.08.1977 г.»

При публикации результатов исследований экспериментатор должен обязательно указать, что проведение данного эксперимента было санкционировано решением Комиссии по биологической этике (КБЭ). Получение разрешения ответственным исполнителем на проведение эксперимента на лабораторных животных возможно только после того, когда исполнитель представит в комиссию по биоэтике «Заявку на проведение биоэтической экспертизы», «Программу экспериментального исследования на животных» и «Обоснование необходимости использования животных в данном исследовании» по установленной форме.

Исследователь должен обязательно представить письменное описание эксперимента, в котором имеется формулировка цели исследования, описание всех экспериментальных процедур и методических приемов, характер и степень дискомфорта и риск возможных осложнений. Описание должно включать физическую активность, диету, прием препаратов, проведение нагрузочных и функциональных проб и др. При планировании эксперимента на животных исследователь обязан руководствоваться принципами «трех R» (replacement — замена болезненных для животных экспериментов опытами, не причиняющими страданий; reduction — уменьшение числа опытов с животными; refinement — улучшение методики с целью облегчения страданий подопытных животных). Во всех случаях следует рассмотреть возможность использования альтернативных методов.

Альтернативный метод — это метод, применяемый для уменьшения количества животных, улучшения условий содержания или замены использования экспериментов на животных в биомедицинских исследованиях и проведения тестов с квалификационной или образовательной целью.

В 1959 г. У. Рассел и Р. Берч издали книгу «Принципы гуманной экспериментальной техники» (*Russell W.M.S., Burch R.L.* The Principles of Humane Experimental Technique), в которой обоснована концепция гуманного использования животных в экспериментах, получившая название «Концепция трех R».

Replacement: выбор и замена

Replacement — *замена* в опыте, когда это возможно, *высокоорганизованных животных* менее развитыми живыми объектами, альтернативными методами: экспериментами на культуре клеток и тканей, изолированными органами, физико-химическими и биохимическими системами, экспериментами на микроорганизмах и растительных объектах, компью-

терными и математическими моделями. Возможно использование культур клеток тканей (методы *in vitro*) при определении общей токсичности химических соединений для человека и животных, оценки иммунотоксичности, нефротоксичности, гепатотоксичности, нейротоксичности, фототоксичности, экотоксичности, канцерогенности. Получены биополимеры, эквивалентные человеческой коже.

Информация о существующих альтернативных методах регулярно публикуется во многих международных журналах, наиболее популярным из которых признан ATLA (Alternatives To Laboratory Animals).

Для медико-биологических экспериментов, в которых лабораторные животные служат *инструментом измерения активности* каких-либо веществ, препаратов, например вакцин, сывороток или гормональных средств, генотип несущественен, вопросы экстраполяции необязательны, поэтому для «биопробы» можно использовать гибриды как линейных животных, так и аутбредных.

Эксперименты, в которых предполагается *моделирование патологических состояний* (онкологические исследования, изучение процессов воспаления, иммунитета, мутаций), проводятся только на *определенных линиях,* так как важна роль генетических факторов в развитии изучаемого состояния. Для выполнения исследований влияния *различных веществ* и *факторов внешней среды* можно ограничиться выбором одной линии или гибридной комбинации.

Если есть информация, входящая в характеристику линии, то выбор существенно облегчается. Например, наиболее чувствительны к химическим мутагенам следующие линии мышей, рекомендованные для цитогенетического тестирования: TPS/Y, 101/HY, C57BL/6Y, WR/Y. Относительно резистентной «нормальной» линией считается линия CBA/LacY.

Существуют линейные различия у животных по степени *иммунного ответа*. Часто низкочувствительные линии к патогенному действию антигена отвечают на него высоким титром антител. Например, линия мышей BALB/c малочувствительна к стафилококковой инфекции, но дает высокий иммунный ответ на вакцину пневмококков группы А, а у мышей линии C57BL/6 отмечена обратная зависимость. В то же время имеются отчетливые параллели, как, например, в случае усиления чувствительности к аудиогенным припадкам инбредные линии мышей располагаются в такой последовательности: G57BL/6, BALB/c, SM, CBA, SJL, AKR. FP, 129, LP, DBA/2.

Отбор той или иной линии основывается прежде всего на генетических и биологических особенностях каждой линии. Возможно использование других категорий генетически контролируемых животных: гибриды первого поколения (F1) от скрещивания двух инбредных линий, конгенные и конгенно-резистентные линии, мутантные линии и стоки, сложные гибриды (тетрагибриды), рандомбредные линии. Выбор животных той или иной категории определяется целью и характером самого исследования.

Reduction: адекватность и стандартизация

Reduction **–** это достижение воспроизводимых результатов с использованием минимального количества животных; адекватный выбор лабораторных животных; использование стандартных по микробиологическим, генетическим и экологическим параметрам животных; оптимальное планирование и, что крайне важно, использование статистических методов не только при обработке полученных данных, но и на стадии планирования. Одним из наиболее надежных путей снижения количества животных, используемых в экспериментах, является дальнейшее развитие и осуществление стандартизации лабораторных животных по генотипу, микрофлоре и экологическим параметрам.

Благодаря уменьшению количества переменных факторов стандартизация может помочь в получении более надежных результатов на меньшем количестве животных. Состояние живых объектов зависит от воздействия многочисленных как экзогенных, так и эндогенных факторов, влияние которых далеко не всегда бывает явным и легко регистрируемым. Среди них прежде всего следует отметить факторы инфекционной и инвазионной природы. Различные, в том числе даже патогенные представители вирусной и бактериальной флоры, не всегда вызывают клинически явную картину заболевания. Часто они протекают в латентной форме или же в виде носительства. В настоящее время актуальность приобретает так называемая оппортунистическая эндогенная инфекция, активизирующаяся при иммунодефицитных состояниях.

Полноценность корма, сбалансированность всех его компонентов является важнейшим условием, обеспечивающим здоровье животного, поддержания неспецифической резистентности его организма на высоком уровне. Велико также воздействие экологических факторов на статус животного – условий его содержания и микроклимата. Все эти моменты, не учитываемые при проведении эксперимента, искажают и даже извращают его результаты.

Refinement: уменьшение дистресса, боли и страданий

Refinement – это улучшение условий содержания лабораторных животных и использования их в экспериментах, уменьшение дистресса животных во время экспериментов и применение обезболивающих средств, но не в ущерб цели эксперимента.

С точки зрения внешних проявлений и физиологии, животные реагируют на непереносимые боль и дискомфорт так же, как и люди. Концепция исследования боли на животных включает в себя представления о том, что животное не должно подвергаться боли в большей степени, чем может выдержать человек.

Альтернативное моделирование и животные-модели

В настоящее время ведутся работы по разработке методов исследований, заменяющих животных в эксперименте. В связи с этим встает вопрос: до какой степени данные модели отражают моделируемый объект и можем ли мы использовать полученные результаты в полной мере? Критичным является тот факт, исследуем ли мы фундаментальный или прикладной аспект науки. Наш мозг является тем компьютером, который устанавливает сходства и различия объектов. Исследователь должен доказать подобие для того, чтобы его исследование стало значимым. Модель и изучаемый объект не могут быть абсолютно идентичны, однако не должно существовать существенных дисаналогий между моделью и моделируемым объектом. На основе теорий эволюции, систем и хаоса можно доказать, что модель и целевой объект не могут быть изоморфны.

Сильная сторона моделирования (с использованием животных или без них) заключается в расширении возможностей, определении существенности, выявлении набора гипотез, которые будут включены в модель. С другой стороны, модель ограничена общими функциями и тем, что нет необходимости устанавливать взаимосвязь между степенью точности и продуктивности, включая этические нормы, которые требуют использования моделей без животных.

Валидность моделей

Валидность модели означает, что модель и моделируемый объект подобны или модель правильно отражает действительность. Модель высокой точности отражает существенные моделируемые механизмы, низкой точности – в малой степени соответствует им. Соотношения между валидностью и проблемой оценки животных-моделей можно классифицировать следующим образом.

1. Животное-модель никогда не является полностью валидированной моделью. В окончательном анализе гипотезы должны быть пересмотрены относительно человека. Потенциальная эффективность модели заключается в ее функционировании, а не в подтверждении или оценке. Нельзя использовать животных для подтверждения гипотезы о недомоганиях у человека. Но можно и нужно изучать на модели гипотезы, касающиеся определенных нарушений здоровья.
2. Животные-модели, подтвержденные в качестве валидированных моделей не всегда эффективны для экспериментальной работы. Валидность в данном случае является лишь отправной точкой для достижения цели. Можно достичь высокой точности модели, которая в результате не даст ничего нового в понимании тех или иных процессов.
3. Большинство животных-моделей в биомедицинских и психологических исследованиях не являются валидными.

Взаимодействие между моделью и моделируемым объектом можно проиллюстрировать следующими примерами.

Понятно, что валидность не является критичной точкой в оценке животных-моделей. Многие виды исследований, например изучение пищеварения, только подтверждают уже описанные в литературе процессы, являясь в лучшем случае их углублением. Такая модель в целом является невалидной. При составлении дизайна опыта исследователь предполагает, что модель даст те же результаты, что и моделируемый объект. Например, при заражении животных инфекционными болезнями. С помощью генной инженерии можно получить модель человеческих генов и они будут абсолютно идентичны генам человека, на полученных тканях можно моделировать многие взаимодействия. Однако течение болезни изучить на такой модели нельзя, результаты не будут идентичны течению болезни в организме человека. Такие модели должны быть дополнены альтернативными моделями (человеческие ткани или культуры органов), непосредственным наблюдением за процессом на основе высоких технологий.

В силу выше сказанного можно сделать вывод, что животное-модель может и должно служить для исследователя генератором гипотез. Наука может использовать в этих целях и другие виды моделирования. Например, компьютерное, математическое моделирование. В любом случае, модель должна пройти процедуру валидации.

Валидация (validation) – это крупномасштабное внутрилабораторное исследование, подготовленное в условиях независимости и организованное

для получения более определенной оценки релевантности и надежности оптимизированного метода для практических целей.

В последние годы под эгидой Европейского Совета в Северной Италии был создан Европейский Центр по утверждению (валидации) альтернативных методов (ECVAM). Центр способствует разработке альтернативных (заменяющих эксперименты на животных) методов, проверяет и утверждает адекватность новых или уже имеющихся методов.

Валидация альтернативного метода — это процесс, при котором уместность применения и его надежность устанавливаются для конкретной практической цели.

Новые методы тестирования должны проходить предварительный процесс *превалидации*, и только после признания того, что этот процесс прошел успешно, они проходят процесс официальной валидации.

Протокол и имитационная модель метода тестирования на первой стадии изменяются в пользу использования альтернативных методов (refine) в обычной лаборатории (с приоритетным экспериментом по использованию теста). Сделанная оценка на второй стадии вносится в протокол, передаваемый в следующую лабораторию с внесением любых необходимых изменений по использованию альтернативных методов в протокол и имитационную модель. В третьей стадии оцениваются ревалентность и надежность тестов в условиях независимости в трех или большем количестве лабораторий (две первые также включены в это число).

Превалидация (prevalidation) — внутрилабораторное исследование, имеющее незначительный масштаб, проводимое в три этапа для гарантии того, что протокол и имеющаяся модель метода тестирования достаточно оптимизированы и стандартизированы для включения в официальное изучение валидности.

Результатом превалидационных изучений является внесение в оптимизационный протокол вносится того, что может быть использовано в официальном валидационном исследовании. В превалидации и валидации могут принимать участие на этой стадии исследования различные национальные и международные институты с достаточным количеством знаний и опыта. В *стадии превалидированных продуктов* (prevalidation) описываются методы, которые следуют за превалидацией, и дается представление о критериях для повторимости и прогнозирования результатов. *Стадия, предшествующая валидации* (undergoing validation), включает статус метода, предшествующего официальной валидации.

Валидность модели означает, что модель и моделируемый объект подобны или модель правильно отражает действительность.

Валидность является следствием надежности: содержание проблемы, повторности и точности измерений формируют степень того, что

измерялось и что должно было быть измерено. В терминологии моделирования надежность не является следствием подобия или точности соответствия модели объекту, а соответствием измерения соответствующих переменных модели.

Так, за замену животных во всех случаях на альтернативные модели в обучении людей ратует Международная Сеть (Inter NICHE). Этой Сетью предлагается включать в процессы исследований и обучения следующие альтернативные методы:

- ✓ мультимедийное компьютерное моделирование (виртуальная реальность, широко распространенная и использующая компьютерный потенциал и программное обеспечение);
- ✓ фильмы и видео (цифровое видео легко встраивается в мультимедийные программы);
- ✓ модели, манекены и симуляторы (классические анатомические средства, манекены для выработки навыков взятия крови, интубации, основных хирургических навыков);
- ✓ этические источники трупов животных и тканей (для выработки ветеринарных навыков берут трупы животных, умерших своей смертью или в результате несчастного случая);
- ✓ клинические работы с животными и волонтерами (работа студентов в реальных клиниках и помощь при работе с реальными пациентами);
- ✓ проведение экспериментов студентами (на мышах, крысах, собаках, кошках и других млекопитающих можно проводить такие эксперименты, как снятие ЭЭГ, ЭКГ и др.);
- ✓ лаборатории *in vitro* (в исследованиях *in vitro* применяют ткани и клетки, которые нужны при изучении дыхания, клетки и электронного транспорта, а также некоторые навыки можно получить при использовании растений (картофель или свекла вместо печени животных).

Кроме того, имеется книга «От морской свинки к компьютерной мыши» с CD, DVD, базой данных и web-версией, переведенная на 12 языков, в которой авторы из разных стран представили свои материалы в разнообразной форме: видеофильмы, библиотека мультимедийных компакт-дисков, web-сайт.

Создание моделей животных

В биомедицине и особенно в инновационной фармакологии мы скоро перейдем от выбора животных *для эксперимента* к созданию спе-

циализированных линий *под задачи исследования*. Тогда планирование эксперимента начнется с постановки задачи для специалиста-фармакогенетика по получению нокаутных или трансгенных животных под будущее лекарство.

Вместо скальпеля и химических субстанций в центре ядра клетки появляются генетические конструкции, позволяющие выявить влияния на биохимическом уровне. Последовательность наших научных манипуляций уже не является такой очевидной, как в ситуации «манипуляция сама по себе», так как они включают в себя сложные молекулярные технологии, такие как наблюдение за моноклональными антителами и ПЦР-маркерами для проверки изменений в белках и ДНК.

В системе «новых экспериментов» следует выделить четыре фазы: получение овоцитов из суперовулированных самок мышей (фаза 1), отбор и трансплантация удачных эмбрионов в суррогатных матерей (фаза 2); маркировка новорожденных детенышей и генетический анализ тканей (фаза 3); программы кросс-бридинга, включающие получение, создание запаса животных, дополнительный генетический анализ (фаза 4).

Основные же условия использования животных в эксперименте: научная методология, возможность применения принципа «трех R», оценка баланса между страданиями животных и важностью целей исследования. Хотя этические нормы в большинстве своем подразумеваемы, редко бывают научными. Однако четыре из них несомненны: *научные* – в виде составления плана на основе подходящей методологии; *экономичные* для уменьшения количества животных; *эмпатичные* – в форме использования методов, уменьшающих страдания/дискомфорт; *скромные*, т.е. использование клеточных культур вместо животных. Пятое, как баланс и основа логики, – *этический принцип пропорциональности*.

Если на каждой из фаз *уровень дискомфорта* оценивается как средний, то мы можем оценить и эксперимент в целом, как имеющий уровень *среднего дискомфорта*. В современных генетических исследованиях на животных один «эксперимент» включает различные действия или *фазы* с различными животными: животные-доноры, животные–суррогатные матери, покалеченные животные, линии животных. Все эти действия необходимы для ответа в отношении одной-единственной цели эксперимента, и это основное отличие от традиционной концепции «эксперимента на животном».

Последовательность шагов понятна, однако большинство исследователей пока не рассматривают все стадии, а продолжают оценивать эксперимент на животном только на основе конечной фазы, а именно использования экспериментальных животных в *провокационных экспериментах* для тестирования удачности модификации. Они не считают, что

Таблица 1

БИОЭТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЖИВОТНЫХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ КАК «МОДЕЛИ ЖИВОТНЫХ»

Принцип Теория	Зооцентрический		Антропоцентрический
	Классическая	Новая	С позиций общества
Очистка	Боль, страдания, стресс	+ 4 фазы	Оценка общего плана
Цели	Научные цели	Успех манипуляций	Польза для общества
Снижение	Статистика инбредных линий	Экстра-кросс разведение Квалифицированные генные инженеры Продажа линий	Рост числа животных Тревога от патентования «жизни»
Замещение	Стимулирование клеточных культур	Стимулирование генетически модифицированных клеточных культур	Получение жизни *in vitro* может быть рискованным для общества

предыдущие четыре фазы являются также фазами эксперимента. Таким образом, животные, участвующие на первых четырех фазах, не учитываются в отчетах официальной статистики, и их этическая оценка не осуществляется.

С теоретической и этической позиций существуют два угла зрения и учета первых четырех фаз опыта. В одном случае, необходимо оценить перспективу для животного – это *зооцентрическая перспектива*, когда максимальный уровень дискомфорта для животного не должен превышать «среднего» уровня. В другом – мы должны оценивать критическое отношение в обществе – *антропоцентрическая перспектива*. Следовательно, планируя эксперимент, мы должны принимать во внимание оценку всех его стадий, на которых может возникнуть дискомфорт. Таким образом, эксперимент разбивается на множество шагов, которые могут включать средний дискомфорт, после чего оценивается вся совокупность. В противовес «простой» традиционной схеме (пятифазной) эксперимента, этот современный подход может оказаться весьма проблематичным, так как наличие нескольких фаз со средним дискомфортом может сделать оценку всего эксперимента выше среднего уровня (Таблица 1).

Стремительное развитие молекулярной медицины, генной инженерии породило огромное древо новых биомедицинских технологий. Если условиться с терминологией, подразумевая, что *транскриптом* – это все транскрибируемые РНК-последовательности, *протеом* – это все белки, кодируемые геномом, а *метаболом* – это межбелковые взаимодействия в процессах обмена веществ и жизнедеятельности организма, то можно выстроить структуру партитуры «Оды жизни» не т*олько животных, но и человека будущего: геном→транскриптом→протеом→метаболом→биотран-*

сформ. В данном случае *биотрансформ* – это не только трансформация в организме, но и биотрансформация самого организма. Моделирование этих процессов – процесс не быстрый. Возможно, весь XXI век уйдет на познание фенотипических полиморфизмов от клеточного до организменного уровня человека как прототипа всех возможных биомоделей.

Если ген является элементарной структурой наследственности, то клетка – элементарная единица жизни, поскольку любые молекулы от самой малой до РНК и ДНК работают только в клетке.

Подобные современные тенденции биологии, цитологии, геномики, транскриптомики, протеомики, биоинформатики, бионики объединяются, а сумма знаний интегрируется в новом научном направлении – *целломике* (от cell – клетка).

Выбор метода для *замены* животных изначально был мотивирован нами снижением количества живых животных в опыте. Но в методах *in vitro* уже очевидны альтернативы, которые в большей степени перекрывают риски страданий, нежели в вивисекционных экспериментах. Однако в эру новой биомедицины и биотехнологий жизнь может быть, как мы уже убедились, в отдельных клетках вне животного. Можем ли мы считать данные созданные существа альтернативами? На данном этапе развития науки на этот вопрос следует ответить утвердительно, рассматривая его как концептуальное пространство создания новых «моделей животных», что существенно изменит наши взгляды на пути поиска новых лекарств и предопределит новые основы инновационного фармакомоделирования.

Криотехнологии

Из эмбрионов мышей, замороженных в жидком азоте 12-15 лет назад, были успешно получены молодые особи животных. Предстоит глубже изучить этот метод прежде, чем использовать на постоянной основе в отношении различных видов живых существ, особенно человека. Основной целью криогенной заморозки эмбрионов мышей является достижение гарантии того, что вся линия или популяция не будут потеряны в результате болезни или несчастного случая. Более того, это наиболее экономичный метод поддержания значительного количества будущих особей, необходимости в которых в данный момент нет, но может вскоре возникнуть.Криотехнологии могут использоваться для транспортировки коллекционных линий для предотвращения генных изменений в инбредных линиях, для экспериментов в преимплантационной эмбриологии, а также создания популяций для получения *высококачественных* и *достоверных* экспериментальных данных.

Для проведения успешного криогенного сохранения эмбрионов мышей необходимо недорогое, но качественное оборудование, реактивы высокой степени очистки, но главное – специалисты в области преимплантационной эмбриологии, имеющие успешный опыт криогенного сохранения эмбрионов. Оборудование, необходимое для криогенной заморозки, включает в себя частично опорожненные колбы, приспособления для обращения с жидким азотом, CO_2-инкубаторы, термопары, регистрирующий прибор и микроскопы с цифровой камерой и компьютером.

Донорами эмбрионов обычно являются препубертатные мыши в возрасте около 21 дня. С помощью сыворотки беременной кобылы и человеческого хорионического гонадотропина у самок вызывают гиперовуляцию и затем их спаривают с племенными самцами. Доказательством успешного спаривания является наличие вагинальной пробки, со дня ее обнаружения начинается отсчет дней. На третий день мышь убивают и извлекают матку и фаллопиевы трубы. Из фаллопиевых труб с помощью соответствующего инструмента вымываются эмбрионы, которые на этот момент должны находиться на стадии 8-клеточного развития. Далее из общей массы эмбрионов выбраковываются поврежденные или недоразвившиеся. Оставшиеся эмбрионы в среде с соответствующим криопротектором (диметилсульфоксид) помещают в пробирки или трубочки, подготовленные для заморозки. Далее они охлаждаются до почти полной заморозки, и колбы закупориваются кристаллом льда для предотвращения переохлаждения. После этого эмбрионы замораживают. Обычно скорость охлаждения низкая (около 0,4 градуса в минуту). С момента достижения эмбрионами температуры –80°С скорость охлаждения можно увеличить, пока степень заморозки не будет соответствовать температуре жидкого азота (–196°С). При этой температуре эмбрионы могут сохраняться неограниченное количество времени.

Когда возникает необходимость в эмбрионах, их размораживают, используя принятый в лаборатории метод. Обычно это происходит при комнатной температуре или в ванне с температурой воды 37°С. Неповрежденные эмбрионы отбирают, омывают и выращивают 24 часа в подходящей среде в CO_2-инкубаторе. Если эмбрионы жизнеспособны, они развиваются в бластоцисту, подходящую для имплантации.

За 2 дня до размораживания эмбрионов нескольких псевдобеременных мышей, будущих суррогатных матерей, подготавливают к приему эмбрионов путем спаривания со стерильным самцом (стерилизованным с помощью вазектомии или генетически стерильным). Будущая суррогатная мать получает анестезию, ей делают один кожный надрез и далее по надрезу в верхней брюшине по обеим сторонам от позвоночника с тем, чтобы обнажить боковые стороны матки. С обеих сторон матки де-

лается по маленькому надрезу, через которые помещается 4–6 эмбриона. Кожный надрез закрывается с помощью зажима. Если операция прошла успешно, через 18–19 дней должны родиться мышата. Квалифицированный специалист может получить 30–40% жизнеспособных молодых особей из общего количества замороженных эмбрионов.

Использование и ограничения в использовании приматов

Принципы «трех R» существенно ограничивают применение высокоорганизованных животных в экспериментах. Там, где это возможно, необходимо использование более низко организованных животных и немлекопитающих. Однако в ряде биологических, вирусологических и/или поведенческих процедурах адекватные результаты можно получить только на крупных животных и человекообразных обезьянах.

По поведению и выражению эмоций приматы наиболее близки к человеку, чем какие-либо другие животные. Исследователи, проводящие эксперименты на приматах, небезосновательно считают, что полученные результаты будут наиболее близки к ожидаемым результатам для людей. Шимпанзе обычно используют в исследованиях гепатита, мартышки – в исследованиях ВИЧ, проверки вакцин и лекарств, изучении познавательной способности, патологий и болезней человека, злоупотреблении лекарствами, ксенотрансплантологии и других областях. Однако при этом нельзя забывать, что приматы имеют сложную организацию, схожую с человеком. Поэтому при их содержании необходимо уделять внимание их поведению и социальному окружению. Исследователи должны иметь представление о характеристиках поведения, уметь выявлять ненормальное поведение и устранять его причины. Также исследователи должны быть знакомы с литературой по поведению животных, чтобы обеспечить должный уход и содержание. В случае поведенческого стресса результаты эксперимента могут быть искажены.

Изоляция животных приводит к социальной депривации, нарушениям в социальной, сексуальной или исследовательской активности. Поэтому весьма важно обеспечить возможность общения с другими особями того же или другого вида, если это невозможно, то необходимо увеличить общение с людьми.

Однако приматы, которых содержат парами или группами, могут нанести друг другу раны, заразить болезнями, также в группах возможно проявление иерархического доминирования, социального дистресса, отнимание пищи. При формировании групп животных необходимо обращать внимание на минимальное проявление агрессии животных.

Животные должны проявлять минимум беспокойства при различных манипуляциях исследователя.

Приматы формируют коалиции, в которых выражают свои доминирующие способности, выбирают сексуальных партнеров и партнеров по кормлению. Животных которых надо ввести в уже существующую группу, должны содержаться отдельно как можно более короткое время.

В замкнутом пространстве животным необходимо обеспечить возможность деятельности, например сбора пищи, у животных должны быть загородки, укрытия, качели, можно использовать искусственные приспособления (радио, видео, телевидение). Можно показывать видеофильмы о жизни обезьян.

Большинство приматов проявляют реакции вертикальных полетов. Это необходимо учитывать при организации жилища. Животные, особенно *macaca nemestrina*, должны видеть друг друга. Если возможен физический контакт, то надо быть уверенным в том, что животные совместимы.

Взаимодействие между приматами исследователями и обслуживающим персоналом поощряется, но должно иметь меру. Приматов нельзя брать на руки дольше, чем этого требует эксперимент. Также надо учитывать, что и приматы могут заразить человека различными болезнями. Они могут являться носителями различных вирусов, например, *Cercopithecine herpesvirus I* (форма *Herpesvirus simiae*), вирус геморрагической лихорадки и др.

Большинство приматов обладают большой силой и могут поранить обслуживающий персонал. Люди также могут заразить приматов, например корью, туберкулезом. Все работающие с приматами должны надевать защитные перчатки, защиту на руки, маски и защиту для лица. Необходимо постоянно проводить контроль на носительство туберкулеза, а также иметь возможность всегда оказать помощь при укусах и царапинах.

Использование приматов в экспериментальной работе возможно только в тех случаях, когда заместить их другими животными невозможно. Проведение исследований на приматах возможно исключительно по решению и под контролем соответствующей этической комиссии или комитета и строго документировано.

Глава 3

Обучение работе с лабораторными животными

Работа с лабораторными животными, включая уход за ними и проведение экспериментальной работы, требует специальной подготовки. Материалы данной главы раскрывают основные требования к персоналу и программы подготовки сотрудников различных уровней.

Подготовка и переподготовка сотрудников

Работа с лабораторными животными и производство биологических образцов для опытов требуют специализированной подготовки. Особое значение имеет квалификация сотрудников питомников.

Персонал, не имеющий специального образования, должен пройти специальное обучение технологии содержания лабораторных грызунов, уходу и манипуляциям, а также регулярно проходить текущее обучение на семинарах и практических занятиях в соответствии с Программой обучения, принятой в Лаборатории, и стандартным операционным процедурам (СОП). Лаборант допускается к самостоятельному выполнению какой-либо манипуляции на животном после ее освоения под руководством исследователя и сдачи экзамена комиссии, в состав которой входят руководитель исследования, представитель службы контроля качества и ветеринарный врач.

Исследовательский персонал, выполняющий работы на животных, должен иметь соответствующую квалификацию и обладать достаточным практическим опытом в этой области. Научные сотрудники, вновь поступившие на работу, и студенты допускаются к самостоятельной работе с животными только после прохождения образовательного курса, включающего в себя инструктаж с использованием специальной литературы,

руководств и СОПов, и серию соответствующих обязанностям исследователя практических занятий под руководством опытного сотрудника.

Информирование и обучение сотрудников

Все сотрудники информируются:

– о возможных воздействиях вредных производственных факторов (физических, химических и других);
– о способах определения присутствия паров химических веществ в рабочей зоне;
– о назначении знаков возможной опасности;

и обучаются:

– мерам безопасности: соответствующим приемам работы, применению средств индивидуальной и коллективной защиты, последовательности действий в случае чрезвычайных ситуаций;
– способам оказания первой помощи пострадавшим.

Информирование сотрудников проводится до начала работы устно на семинарах и с использованием материалов: инструкций и СОП.

Обучение персонала

1) **Описание специальной подготовки и обучения для работы с применением опасных агентов на животных**

Все сотрудники, приступающие к работе, проходят обязательный вводный инструктаж по охране труда у инженера службы охраны труда и техники безопасности. Вводный инструктаж включает в себя рассмотрение общих вопросов по безопасной работе (пожаробезопасность, электробезопасность, работа с вредными химическими веществами).

За проведение инструктажа на рабочем месте отвечает руководитель лаборатории. Инструктаж включает в себя ознакомление нового сотрудника с основными правилами работы в лаборатории с учетом специфики обязанностей. После инструктажа вновь принятый персонал проходит стажировку на рабочем месте. Допуск к самостоятельной работе происходит после специального обучения, которое включает в себя семинары, изучение СОПов, а также практический тренинг под руководством сотрудника, имеющего опыт выполнения той или иной операции.

Уже работающий персонал проходит текущее обучение в случае изменения технологии либо использования новых реактивов и оборудования, новым СОПам, а также в случае нарушения кем-либо из сотрудников правил техники безопасности.

Перед началом исследования проводятся семинары для информирования сотрудников о специфике процедур в исследовании, правилах безопасной работы, опасности применяемых веществ и способах защиты. Обучение проводится устно, а также согласно СОПам по технике безопасности и руководствам на вещества, используемые в исследовании.

2) Описание образовательных программ

Программа обучения персонала, осуществляемая в лаборатории, включает темы по профессиональной безопасности, в том числе по профилактике зоонозов и возникновения аллергий на лабораторных животных, безопасности работы с животными и персональной гигиене. Перед началом исследования и при необходимости с персоналом проводятся специальные семинары по правилам работы с конкретным видом лабораторных животных, используемыми в исследовании химическими веществами и материалами.

Программы обучения персонала

В мире существует сложившаяся практика подготовки и переподготовки персонала, работающего с лабораторными животными. В частности, FELASA (Federation of European Laboratory Animals Science Associations – Федерация европейских научных ассоциаций по лабораторным животным), в которую входят Франция, Италия, Балтийские государства, Бельгия, Чешская Республика, Германия, Австрия, Греция, Соединенное Королевство Великобритании и Северной Ирландии, Ирландия, Нидерланды, Скандинавские государства, Испания, Швейцария, разработали программы подготовки специалистов различных уровней.

В процессе детальной разработки данных требований FELASA выделила четыре категории лиц, имеющих отношение к экспериментам на животных (которые не являются взаимоисключающими), впоследствии одобренные Европейским Союзом [EU 1992] и Правлением Совета Европы по многосторонним консультациям [CE 1993]:

категория A – лица, осуществляющие уход за животными;
категория B – лица, проводящие эксперименты на животных;
категория C – лица, ответственные за руководство экспериментами на животных;
категория D – специалисты в области науки о лабораторных животных.

В основе рекомендаций FELASA лежат общие для каждой категории лиц задачи, обязанности и ответственность. Такой подход предпочтительней номенклатуры, которая может значительно различаться в зависимости от страны. Четыре учебных плана представляют перечень необходимых для изучения тем и объем подготовки. Для категорий A и D предусмотрено детальное профессиональное образование, в то время как для категории B и C предлагаются относительно короткие курсы.

Рекомендации не касаются вопросов глубины изучения предметов или квалификации преподавателей. Это будет представлено другими рабочими группам FELASA по аккредитации образования и обучения по всем категориям.

Практические, теоретические и этические аспекты формируют общую и фундаментальную основу образования и обучения в рамках всех категорий. Руководящими принципами являются: совершенствование методических приемов, сокращение количества используемых животных и их замена, где это возможно, методами без привлечения существ, обладающих сознанием и разумом.

В категории A степень компетентности персонала может быть отнесена к четырем уровням, достижение каждого из которых вместе с соответствующим опытом, где это уместно, может служить требованием к переходу на следующий уровень:

* 1-й уровень – основной уход за лабораторными животными;
* 2-й уровень – 1-й уровень плюс не менее чем 2-летняя практика;
* 3-й уровень – 2-й уровень плюс не менее чем 3-летняя практика;
* 4-й уровень – более высокая руководящая должность или специализация.

Обязанности и обязательства персонала на всех четырех уровнях и программа обучения для 1—3-го уровней изложены ниже. Своеобразие функций персонала 4-го уровня делает стандартную программу неподходящей, присвоение этого уровня, как правило, основано на признании личного опыта и способности к руководящей работе.

Программы содержат темы, необходимые для образования и обучения персонала, занятого уходом за животными, на каждом уровне, и представляют собой совокупность программы FELASA для категории C, изучаемой в соответствующих деталях, и соображений по управлению объектом и его планированию, относящихся к 3-му уровню. Темы, предусмотренные для одного уровня, могут изучаться более глубоко на другом уровне, например законодательные и этические аспекты.

Количество часов формального обучения на 1—3-м уровнях и соответствующий опыт работы (выраженный количеством лет), необходимый для получения квалификации, дающей возможность приступить к этому обучению, отличаются в странах, где уже имеются курсы. Это в значительной мере зависит от подхода к временному балансу между теоретическими и практическими занятиями и обязательности требований

к владению формальными навыками, чтобы приступить к обучению на 1-м уровне. Практические навыки работы в течение 4–5 лет и внедрение системы обучения персонала, занятого уходом за лабораторными животными, обычно достаточны для получения 1-го и 2-го уровней и дает возможность перейти на 3-й.

Переход с одного уровня на следующий не является автоматическим. Это связано с тем, что не все успешно работающие на одном уровне хотят или способны перейти на следующий. Этот факт может создать проблему для тех, кто остановился на 1-м уровне, где основным существенным компонентом выполняемых работ является уход за животными. Независимо от основных знаний необходимо продемонстрировать определенный уровень практической компетентности. Для соответствия этому критерию существующие схемы обычно требуют около года практической работы под непосредственным руководством специалистов; любое теоретическое обучение является либо приложением к этому, либо включается в практическое обучение, либо требуется и то, и другое.

Категория A FELASA – 1-й уровень

Все обязанности выполняются под непосредственным руководством опытного специалиста по уходу за животными.

Квалификация: точное выполнение установленного рабочего порядка и процедур, следование устным или письменным инструкциям, умение общаться устно, вести документацию.

На этом уровне обычно нет необходимости в получении академического или соответствующего профессионального образования, за исключением Нидерландов, где курс инструктажа является обязательным. Опыт работы не является столь существенным фактором (за исключением Нидерландов), как общий интерес к работе с животными и правильное выполнение рутинных процедур, связанных с правильным содержанием животных и уходом за ними.

Получить статус персонала этого уровня могут лица разных возрастных групп с различной рабочей квалификацией и академическими знаниями.

Возможные направления деятельности

ОБЩИЕ ОБЯЗАННОСТИ И ЭКСПЛУАТАЦИЯ ОБОРУДОВАНИЯ

1. Эксплуатация и ежедневное обслуживание оборудования, например моющих машин для клеток/бутылок, оборудования для чистки и стерилизации.
2. Общая уборка и гигиена обслуживаемых площадок, коридоров и т.д.
3. Ликвидация отходов.
4. Сбор, разгрузка и складирование материалов.
5. Участие в процедурах общего микробиологического мониторинга, например в сборе образцов воды и воздуха, обеспечении эффективного функционирования стерилизующего оборудования.

УХОД И РАЗВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

1. Чистка, кормление и поение экспериментальных, разводимых и других животных.
2. Компетентность в обращении с традиционными видами лабораторных животных.
3. Ежедневные наблюдения и осмотр животных в соответствии с условиями содержания (включая отметку принятия пищи/воды). Сообщение инспектору о любых изменениях.
4. Выполнение некоторых методов эвтаназии в соответствии с детально описанными процедурами, например ингаляции углекислого газа.
5. Общее содержание помещения(й) для животных, очистка, пополнение запасов предметов потребления.
6. Регистрация показателей среды в помещениях для животных (температура, влажность и т.д.) и процедур, проводимых в помещениях (ежедневных действий). Доклад о любых отклонениях от указанных параметров.

БЕЗОПАСНОСТЬ

Соблюдение стандартных процедур, регулирующих безопасную работу в подразделении, грамотное обращение с веществами, защита от аллергенов животного происхождения, соблюдение личной гигиены, выполнение программы вакцинации и т.д. Осведомленность о личной и коллективной ответственности за безопасность работы.

ЗАКОНОДАТЕЛЬСТВО ПО БИОЭТИКЕ

Осведомленность в вопросах контроля, определяемого национальным законодательством, и этики использования животных.

Категория A FELASA – 2-й уровень

Обязанности, перечисленные ниже, отражают развитие и расширение опыта и практических навыков, освоенных на 1-м уровне. Основным требованием является применение углубленных знаний при работе в различных специализированных учреждениях для животных, а также с возрастающим количеством видов животных, включая требующих специфических навыков разведения.

К этому уровню также относят способность работать более длительное время без прямого руководства, нести ответственность за ежедневные

рутинные процедуры в выделенном(ых) помещении(ях) для животных и выполнять другие специфические обязанности в соответствии с утвержденным стандартом.

В общем, для перехода на этот уровень необходимы как минимум 2-летний предварительный стаж работы и наличие первой профессиональной квалификации. Также должно приниматься во внимание требование Нидерландов – посещение национально признанных курсов инструктажа.

Возможные направления деятельности и обязанности

УХОД И РАЗВЕДЕНИЕ ЖИВОТНЫХ

1. Ответственность за рутинный уход за животными и поддержание режима в прикрепленных помещениях для экспериментальных, разводимых и других животных в конвенциональной, свободной от определенных патогенных организмов (SPF) и барьерной зонах, изоляторах из эластичной пленки, карантинных отделах и других системах содержания/изоляции.
2. Компетентное обращение, фиксация и определение пола (включая определение возраста на основании физических характеристик) у лабораторных животных традиционных и редко используемых видов.
3. Ежедневное содержание колоний разводки неинбредных и генетически определенных животных, включая: формирование под непосредственным руководством групп/линий разводки, отъем молодняка, ведение протоколов (компьютерных или письменных) разведения и подготовка данных по ходу разведения животных.
4. Квалифицированное выполнение разнообразных методов эвтаназии животных различных видов в соответствии с установленными процедурами и/или требованиями закона.

ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ЗА ВЫПОЛНЯЕМУЮ РАБОТУ

1. Получение и выдача животных

Получение, контроль и размещение поступающих животных (выращенных на месте и полученных из коммерческих источников), выдача животных, ведение определенной документации и системы записей.

2. Содействие при выполнении экспериментальных процедур

Послеоперационный уход за экспериментальными животными; помощь исследователям в обращении с животными и их фиксации; содержание животных по специфическим экспериментальным проектам, включая запись наблюдений, например за массой животного.

3. АУТОПСИЯ

Участие в проведении аутопсии, например для экспериментальных целей, осуществления программ наблюдения за здоровьем животных.

4. ОБУЧЕНИЕ

Работа в непосредственном контакте, руководство и помощь новым сотрудникам, обучающимся уходу за животными, в освоении рутинных процедур в соответствии с предполагаемым стандартом.

5. Исполнение ДРУГИХ ОБЯЗАННОСТЕЙ

Способность брать на себя выполнение специфических задач в соответствии с указаниями в отсутствие прямого руководителя.

Категория A FELASA – 3-й уровень

Дальнейшее углубление знаний и опыта, а также освоение навыков руководства и управления формируют основу обязанностей специалиста этого уровня.

Персонал, переходящий на этот уровень, должен иметь 3-летний стаж работы на предыдущих уровнях (т.е. всего 5 лет) и получить дополнительную профессиональную квалификацию.

Возможные направления деятельности и обязанности

1. Организация рутинной работы по уходу за животными и их разведению и руководство ею.
2. Планирование ежедневных рутинных процедур и составление графика работы персонала.
3. Координация ресурсов для обеспечения потребностей.
4. Участие в управлении бюджетом подразделения.
5. Заказ животных, оборудования и других материалов.
6. Управление колониями разводки животных, включая программы их воспроизводства.
7. Организация отправки, транспортировки, получения животных. Знание национальных и международных требований к благосостоянию животных.
8. Рекомендации исследователям по обеспечению животными и размещению средств в соответствии с научными требованиями. Помощь в исследовательских проектах. Контроль за соответствием законодательству.
9. Руководство процедурами мониторинга среды и микробиологического мониторинга, включая программы наблюдения за здоровьем животных.
10. Содействие в обучении и профессиональном росте персонала.
11. Ответственность за дополнительные обязанности в соответствии с указаниями в отсутствие прямого руководителя.

12. Вклад в благосостояние животных (т.е. усовершенствование технологий).
13. Подготовка отчетов и т.д., требующих некоторых знаний статистики.

Категория A FELASA – 4-й уровень

Персонал этого уровня – старшие руководители с определенными навыками в управлении и руководстве виварием. Этот высокий уровень вместе с теоретическими и практическими знаниями в области науки о лабораторных животных, требующимися для выполнения таких функций, может распространяться на категорию D FELASA, дающую определение специалиста по лабораторным животным.

Персонал может повышать свою квалификацию в области науки о лабораторных животных по общим или специальным направлениям.

Возможные направления деятельности и обязанности

1. Координация ресурсов для обеспечения нужд подразделения, в том числе организационных.
2. Введение, установление и реализация правил и процедур, применяемых в подразделении, а также теми, кто пользуется услугами подразделения.
3. Осуществление финансового контроля за бюджетом подразделения.
4. Руководство персоналом всех уровней по уходу за животными.
5. Организация программ обучения и профессионального роста для персонала, ухаживающего за животными.
6. Прием персонала на работу.
7. Сотрудничество с научным персоналом с целью обеспечения ресурсами исследовательских программ.
8. Участие в разработке и проведении экспериментов.
9. Осуществление в случае необходимости связи с вышестоящим руководством.
10. Планирование новых винариев либо усовершенствование существующих зданий или площадей.

Программа обучения для категории A, 1-й уровень

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

Обращение с животными

Требуемые знания:

- ✓ причины и важность правильного обращения с животными;
- ✓ многообразие методов, используемых для безопасного и компетентного обращения с наиболее распространенными видами лабораторных животных, и умение выбирать подходящий метод, основываясь на физических показателях, поведенческих и индивидуальных признаках животных соответствующих видов.

Демонстрация на лабораторных животных наиболее распространенных видов (крыса, мышь, морская свинка, хомяк, кролик):

- ✓ умение брать и держать животное, используя наиболее безопасный и приемлемый способ как для животного, так и для сотрудника;
- ✓ умение квалифицированно извлекать животное из клеток различного типа и помещать его обратно.

Уход и разведение

Требуемые знания:

- ✓ необходимость рутинных процедур при уходе за животными в соответствии с их биологическими и поведенческими потребностями;
- ✓ соответствующие программы содержания лабораторных животных наиболее распространенных видов, таких как крыса, мышь, морская свинка, хомяк, кролик;
- ✓ специальные требования к уходу, например, за разводимыми, экспериментальными животными;
- ✓ основные питательные компоненты диет для животных и их подача, в частности, необходимость специальной диеты для животных некоторых видов или разводимых животных;
- ✓ соответствующие режимы питания, способы обеспечения пищей;
- ✓ потребность в постоянном источнике воды, соответствующие способы ее подачи;
- ✓ цель размещения животных в клетках, признаки хорошего дизайна клеток в соответствии с видом животного и целью, с которой оно содержится;
- ✓ необходимость обеспечения животных подходящим подстилочным и гнездовым материалом, а также умение выбрать соответствующий материал;
- ✓ понятие обогащения среды обитания в свете благосостояния животных, решающие факторы режима ухода за животными и их содержания.

Рутинные процедуры в виварии

Требуемые знания:

- ✓ необходимость регулярной уборки помещений для животных и вспомогательных площадей, а также соблюдение определенного режима уборки в учреждении;
- ✓ правила использования и безопасного обращения с оборудованием для мойки и стерилизации;

- ✓ необходимость контроля микробиологических и других условий окружающей среды и их регистрация;
- ✓ необходимость личной гигиены и соблюдение определенных правил в работе и процедур для защиты персонала и животных.

Контроль за здоровьем животных
Требуемые знания:
- ✓ необходимость и важность контроля за здоровьем, признаки (как общие, так и специфические для соответствующих видов животных), которые могут указывать на отклонения от нормы, и действия, которые необходимо предпринять.

Эвтаназия
Требуемые знания:
- ✓ причины для проведения эвтаназии и ее дефиниция;
- ✓ наиболее широко используемые методы, в частности, ингаляция углекислого газа;
- ✓ факторы, учитываемые при выборе подходящего метода.

Законодательство и биоэтика
Осведомленность о национальных и европейских законах, контролирующих использование животных в научных целях, и связанных с этим этических аспектах.

Программа обучения для категории А, 2-й уровень

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

Содержание и уход
Требуемые знания:
- ✓ биологические потребности лабораторных животных в отношении практики ухода и содержания;
- ✓ стандарты по уходу и содержанию лабораторных животных с учетом их согласованности с национальными и европейскими правилами и практическими руководствами;
- ✓ концепция барьерной системы; рабочая практика поддержания целостности барьера при работе с животными с определенным микробиологическим статусом, неизвестным статусом здоровья и с животными, экспериментально инфицированным потенциально опасным материалом; содержание животных в изоляторах.

Обращение
Демонстрация знаний и компетентности:
- ✓ обращение с лабораторными животными разнообразных видов; определение их возраста и пола различными методами;

- ✓ выбор соответствующих способов фиксации, связанных как с уходом за животными, так и с научными процедурами на животных.

Разведение
Требуемые знания:
- ✓ биология репродуктивной системы лабораторных животных широко используемых видов;
- ✓ системы разведения общего пользования, практические соображения по внедрению и поддержанию таких программ;
- ✓ мониторинг разведения, ведение записей, критерии отбора племенных стоков;
- ✓ применение генетических принципов в получении генетически определенных линий, определение генетических линий, соответствующие программы разведения.

Эвтаназия
Требуемые знания:
- ✓ методы эвтаназии лабораторных животных определенных видов;
- ✓ законодательные ограничения или рекомендации по использованию данных методов; факторы, влияющие на выбор метода; констатация смерти.

Питание
Требуемые знания:
- ✓ возможности удовлетворения требований к питанию лабораторных животных, типы и состав диет;
- ✓ факторы, влияющие на выбор диет, и практика кормления; эффект специальной обработки питательного состава, например облучения.

Мониторинг, ведение записей и отчет о состоянии здоровья
Требуемые знания:
- ✓ общие проблемы заболеваний лабораторных животных определенных видов, выявление признаков заболевания, зоонозы;
- ✓ важность профилактики заболеваний и контроля, роль микробиологического тестирования, реализация программ поддержания здоровья.

Безопасность
Требуемые знания:
- ✓ необходимость безопасной рабочей практики, применение местных протоколов и национального законодательства для контроля здоровья и безопасности на рабочем месте;
- ✓ меры против биологических, химических и других факторов риска; техника безопасности при эксплуатации оборудования и использо-

вании других материалов; соблюдение личной гигиены; аллергия на лабораторных животных.

Законодательство

Демонстрация:

- ✓ детальные практические знания национального и европейского законодательства, контролирующего использование животных в научных целях; знание других соответствующих законодательств, национальных и международных практических руководств.

Требуемые знания:

- ✓ применение этических принципов при использовании животных в научных целях;
- ✓ использование альтернативных методов.

Экспериментальные процедуры

Требуемые знания:

- ✓ общие пути введения веществ экспериментальным животным; факторы, влияющие на выбор способа введения; подготовка дозированного материала; дозы и частота введения;
- ✓ методы удаления и сбора жидкостей из организма; факторы, влияющие на выбор метода; объемы и частота сбора образцов;
- ✓ до- и послеоперационный уход; роль и ответственность персонала, занятого этим; соответствующие линии коммуникаций;
- ✓ принципы анестезии и анальгезии; признаки боли, дискомфорта и дистресса у животных соответствующих видов.

Программа обучения для категории А, 3-й уровень

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

Управление виварием

Требуемые знания:

- ✓ управление учреждением, эффективное использование ресурсов, управление бюджетом, производственные отношения в отделе и вне его, реализация процедур и правил для эффективной и безопасной работы вивария, подготовка отчетов, использование компьютерных программ управления;
- ✓ принципы управления персоналом; контроль за работой персонала, дисциплина, мотивация, развитие и назначение; прием на работу и интервьюирование; обучение и образование; постановка производственных задач.

Планирование вивария

Требуемые знания:

- ✓ роль дизайна, планирование и дизайн вивария в соответствии с определенными целями, соответствие законодательным требованиям, обеспечение сервиса, финансовый контроль.

Разведение

Требуемые знания:

- ✓ управление колониями разводки животных, получение и поддержание генетически определенных линий и аутбредных стоков, процедуры генетического мониторинга.

Питание

Требуемые знания:

- ✓ разработка практических и теоретических аспектов требований к питанию лабораторных животных; составление и обеспечение специальными диетами; варьирование состава диет; обеспечение тестирования качества; факторы, влияющие на хранение и использование кормов.

Уход / содержание животных

Требуемые знания:

- ✓ содержание, уход и разведение лабораторных животных наиболее редких видов, например рептилий, амфибий.

Мониторинг среды

Требуемые знания:

- ✓ управление микро- и макросредой, контролирующее и регистрирующее оборудование, интерпретация результатов, обеспечение резервных систем.

Профилактика болезней и контроль

Требуемые знания:

- ✓ поведенческие и клинические признаки заболеваний;
- ✓ патология распространенных заболеваний лабораторных животных;
- ✓ профилактика заболеваний, контроль и лечение; влияние заболевания и медикаментов на интерпретацию результатов экспериментов, процесс разведения животных и т.д.; эффекты субклинических заболеваний;
- ✓ микробиологические процедуры, связанные с программами скрининга; интерпретация результатов; факторы, влияющие на принятые действия; схемы мониторинга здоровья.

Законодательство

Практические знания:

- ✓ национальные и международные акты, распоряжения, директивы, программы и кодексы, непосредственно относящиеся к управлению виварием.

Транспортировка

Практические знания:

- ✓ национальные и международные требования и документация; использование официально признанных агентов, вопросы благосостояния животных.

Анестезия и анальгезия

Требуемые знания:

- ✓ принципы проведения анестезии, выбор и введение анестетиков, видовая специфичность, оборудование для анестезии и контроля за ее ходом;
- ✓ премедикация, мониторинг и поддержание анестезии, осложнения, уход после анестезии.

Хирургия

Требуемые знания:

- ✓ принципы хирургии, асептическая техника, хирургические инструменты и уход за ними, материалы и техника для наложения швов, заживление ран;
- ✓ до- и послеоперационный уход, осложнения и восстанавливающие действия, распознавание инфекций и боли и контроль за ними;
- ✓ принципы работы диагностического и контролирующего оборудования, например радиографического, эндоскопического, для снятия электрокардиограмм и электроэнцефалограмм.

Планирование экспериментов

Требуемые знания:

- ✓ общие принципы планирования и проведения экспериментов, ведение протоколов экспериментов, статистический контроль экспериментов, ведение записей.

Здоровье животных

Требуемые знания:

- ✓ практические аспекты нормального и ненормального поведения животных; состояния комфорта, боли и дистресса; физиологические, иммунологические, биохимические и поведенческие аспекты стресса; типы стрессоров;
- ✓ роль внешней среды в поддержании здоровья животных.

Рекомендации FELASA по образованию и обучению лиц, проводящих эксперименты на животных (категория В)

Лица, проводящие эксперименты или принимающие в них участие, включая обязанности по надзору, должны иметь соответствующее образование и пройти надлежащее обучение. Ниже приведены рекомендации по образованию и обучению лиц категории В, которые отвечают за проведение экспериментальных и других научных процедур на живых животных.

Обязанности специалиста категории В

Специалист категории В должен:

1) знать европейские и национальные законы, касающиеся проведения экспериментальных и других научных процедур на животных;
2) знать и соблюдать принятые в обществе этические нормы, касающиеся исследований на животных;
3) понимать и учитывать общие правила, действующие в виварии, где проводятся процедуры;
4) понимать теоретическую основу поставленных задач с тем, чтобы сохранить здоровье животного и гарантировать актуальность полученных научных данных;
5) быть компетентным в обращении с животными и владеть другими техниками, которые предполагается использовать;
6) уметь распознавать боль и признаки дискомфорта и оценивать состояние здоровья подопытного животного;
7) знать, какие следует предпринять шаги для эффективного устранения неблагоприятных последствий, возникающих в ходе или после проведения процедуры;
8) быть хорошо информированным об использовании лабораторных животных и уметь принимать соответствующие меры по сведению до минимума факторов, влияющих на проведение процедуры.

Компетентность

В данном документе компетентность определяется не продолжительностью какого-либо особого периода обучения и образования, а скорее как способность специалиста выполнять свои обязанности. По мнению рабочей группы, для выявления уровня достигнутой компетентности необходима ее оценка в конце периода обучения.

На практике было выявлено, что для получения новым кандидатом основного уровня компетентности будет достаточно курса продолжительностью около 40 часов, половину которого составляют практические занятия под непосредственным наблюдением соответствующего компетентного специалиста. В процесс обучения должны быть включены только те процедуры, которые по требованию лица, проходящего обучение, абсолютно необходимы. Содержание программ может быть изменено в соответствии с непосредственными задачами, при этом некоторые детали могут быть изъяты или добавлены. Таким образом, достижение компетентности может быть ограничено одним видом животных или группой

видов, или группой процедур. Впоследствии уровень компетентности может быть повышен в процессе дополнительного обучения.

Учебный план

А. Законодательство, этика и принципы 3R

Знание и понимание:

1) европейских и национальных законов, касающихся использования животных в научных целях;
2) важности ответственного отношения к использованию лабораторных животных;
3) принципов 3R – снижение (Reduction), уменьшение дистресса (Refinement), замена (Replacement);
4) пригодности и применяемости альтернативных и дополнительных методов.

Б. Основы биологии и содержание лабораторных видов животных

1. Основы биологии

- ✓ знание строения и функций основных органов и систем в объеме, достаточном для проведения процедуры;
- ✓ знание физиологии и биохимии в объеме, достаточном для проведения процедуры;
- ✓ знание границ физиологических параметров в норме, представление о биологической вариабельности;
- ✓ знание поведенческих и физиологических характеристик, относящихся к проведению процедур;
- ✓ компетентность в области разведения животных и использования соответствующих генетических методов (например, трансгенного и нокаутного методов), касающихся проведения процедур;
- ✓ знание о существовании циркадных ритмов и их практическом значении.

2. Содержание

- ✓ знание требований к параметрам окружающей среды, касающихся систем содержания животных, а также европейских и национальных постановлений, руководств и(или) сводов законов, регулирующих практическую деятельность;
- ✓ представление о взаимодействии животного с окружающей средой;
- ✓ осведомленность о путях обогащения окружающей среды, способствующих удовлетворению поведенческих и социальных нужд животного;
- ✓ освоение норм и установленного порядка по уходу за животными;

- ✓ классификация животных в соответствии с их микробиологическим статусом;
- ✓ осознание важности надлежащей гигиены вривариях лабораторных животных в свете предупреждения и контроля заболеваний, а также ее значения для экспериментальных результатов и благосостояния животных;
- ✓ представление о взаимосвязи между микробным заражением и здоровьем животных и их влиянии на результаты экспериментов;
- ✓ информированность о требованиях к питанию животных и установленном порядке кормления;
- ✓ оценка пригодности различных рецептур, типов специальных диет и разных режимов питания;
- ✓ представление о воздействии характера питания на результаты экспериментов, включая изменения в составе диет, а также последствиях чрезмерного и недостаточного кормления;
- ✓ понятие о факторах, влияющих на выбор специальных диет и режимов питания;
- ✓ осознание необходимости постоянной подачи питьевой воды и различные способы обеспечения этого процесса;
- ✓ осведомленность о пригодности и применяемости различных типов подстила и используемых для этого материалов.

В. Обеспечение физиологических потребностей и уровня здоровья животных без ущерба научной достоверности исследования или процедуры

1. Физиологические потребности

- ✓ понимание, какие факторы следует учитывать при оценке здоровья животных;
- ✓ информированность о поведенческих и относящихся к окружающей среде потребностях животных в свете их здоровья;
- ✓ наблюдение и толкование особенностей поведения соответствующих видов животных;
- ✓ представление о путях максимального повышения здоровья соответствующих видов лабораторных животных в процессе их содержания.

2. Здоровье животных

- ✓ оценка уровня стресса, дистресса или испытываемого животным страдания;
- ✓ осознание важности регулярных контактов с человеком во избежание ненужного дистресса у лабораторных животных;

- ✓ понимание необходимости максимальной стандартизации животных как обязательного условия сокращения их количества и знание путей достижения этого в свете их здоровья;
- ✓ распознавание признаков ухудшения здоровья у животных соответствующих видов.

3. Научная достоверность

- ✓ информированность о потенциальном влиянии социального поведения животных на научную достоверность исследования;
- ✓ понимание важности адаптации лабораторных животных к установившемуся режиму содержания до начала эксперимента;
- ✓ осведомленность о важности мер, предпринимаемых в целях сведения до минимума стресса при размещении соответствующих лабораторных видов;
- ✓ информированность о влиянии комплекса факторов окружающей среды на биологическую вариабельность, а также отдельных животных;
- ✓ осознание важности состояния здоровья животного с учетом научной достоверности исследования;
- ✓ знание преимуществ животных, адаптированных к определенным условиям до начала экспериментальных исследований;
- ✓ представление о преимуществах использования обученных экспериментальных животных и путях достижения этого.

Г. Обращение с животными, использование основных техник и эвтаназия

1. Обращение и поведение

- ✓ понимание принципов и важности корректного обращения и нормального поведения в свете их предполагаемого применения;
- ✓ выбор подходящего способа фиксации;
- ✓ отбор и использование соответствующих методов идентификации (маркировки).

2. Введение веществ

- ✓ знание путей распределения и вывода из организма наиболее широко используемых соединений при различных способах их введения;
- ✓ введение соединений и выбор способа введения в зависимости от условий и целей эксперимента;
- ✓ владение правильной техникой (а также распознавание известных побочных эффектов) перорального, подкожного, внутримышечного, внутрибрюшинного и внутривенного введения соединений.

3. Способы забора образцов

- ✓ знание методов, используемых для забора образцов крови, жидких сред организма, фекалий и мочи;

- ✓ демонстрация правильного забора образцов крови, фекалий и мочи;
- ✓ осведомленность о причинах ограничения частоты сбора образцов и их объема;
- ✓ обсуждение преимуществ и недостатков этих методов;
- ✓ демонстрация правильных способов хранения биологических образцов.

4. Эвтаназия

- ✓ определение эвтаназии и перечень причин для ее проведения;
- ✓ характеристика наиболее часто используемых методов эвтаназии;
- ✓ отбор соответствующего (их) метода(ов) в соответствии с целью и условиями эксперимента;
- ✓ представление о неприемлемых методах эвтаназии;
- ✓ проведение эвтаназии и подтверждение смерти животного химическим или физическим методом.

5. Сбор данных

- ✓ составление протокола эксперимента с использованием животных;
- ✓ сбор и хранение данных в соответствии с принципами добротной лабораторной практики [Good Laboratory Practice (GLP)].

Д. Выявление недостатков в сфере благосостояния животных и других усложняющих факторов

1. Оценка здоровья

- ✓ наблюдение за состоянием здоровья и его оценка у используемых видов животных;
- ✓ представление о биологической вариабельности, присущей нормальным здоровым животным;
- ✓ ознакомление с литературными источниками, содержащими физиологические данные по используемым видам животных.

2. Распознавание боли, страдания и дистресса

- ✓ распознавание признаков боли, страдания и дистресса, представление о концепции гуманного умерщвления и необходимости их определения перед процедурами;
- ✓ знание главных стресс-факторов для используемых видов животных;
- ✓ оценка степени и понимание границы «жестокости» процедуры.

3. Распознавание заболевания

- ✓ распознавание признаков заболевания у используемых видов животных и предпринимаемые в данном случае действия;
- ✓ мониторинг здоровья и профилактика заболеваний в зависимости от используемых видов животных и процедуры;
- ✓ осознание важности заболеваний, протекающих в скрытой форме.

Е. Анестезия, анальгезия и основные принципы хирургии

1. Методы анестезии

- ✓ определение анестезии;
- ✓ знание показаний к проведению общей и местной анестезии;
- ✓ представление об основных методах проведения общей анестезии;
- ✓ осведомленность о препаратах, наиболее часто используемых для проведения анестезии, специфических показаниях и противопоказаниях к их применению.

2. Дооперационный уход

- ✓ осознание важности дооперационного физического осмотра и значения ограничения приема пищи;
- ✓ понимание важности премедикации как средства, обеспечивающего благополучие животного и более плавное введение в состояние наркоза;
- ✓ представление о наиболее часто используемых транквилизаторах, антихолинергических средствах и их правильном введении;
- ✓ подготовка животного к хирургическому вмешательству.

3. Наркоз

- ✓ оценка глубины наркоза у используемых видов животных;
- ✓ осознание важности контроля за ходом анестезии, поддержание и регистрация соответствующих показателей;
- ✓ представление об осложнениях, обычно возникающих при анестезии, и умение на них быстро реагировать;
- ✓ использование аппаратов для проведения анестезии;
- ✓ знание об основных препаратах, вводимых для выведения из наркоза.

4. Послеоперационный уход, анальгезия

- ✓ внимательное наблюдение за животным в послеоперационный период, контроль дыхания, пульса, температуры, области, где было проведено хирургическое вмешательство, и общего состояния;
- ✓ распознавание и быстрое устранение осложнений, возникающих после применения анестезии;
- ✓ представление о положительном влиянии анальгезии и введения анальгетиков;
- ✓ знание характеристик и осведомленность о продолжительности действия наиболее широко используемых анальгетиков.

5. Основные принципы асептической хирургии

- ✓ понимание важности поддержания стерильности в операционной и проведения асептических процедур;
- ✓ подготовка и правильное проведение стерилизации хирургических инструментов и тампонов, шовного и перевязочного материала.

Ж. Гигиена труда и безопасность

1. Зоонозы и опасные патогенные факторы

- ✓ представление о состоянии здоровья исследуемых животных, основных патогенных факторах, оказывающих на них влияние, и связанном с этим риском для человека.

2. Опасные химические соединения

- ✓ осведомленность об основных факторах риска, связанных с обращением с наиболее широко используемыми категориями газов, растворителей, кислот, щелочей и солей, применяемыми в биомедицинских исследованиях и тестировании;
- ✓ знание основных факторов риска, связанных с обращением с лекарственными препаратами и другими фармакологически активными тест-субстанциями;
- ✓ правильное толкование символов и предостерегающих надписей на этикетках фармакологически активных субстанций;
- ✓ осознание потенциальной опасности неправильного смешивания различных химических соединений.

3. Биологическая опасность

- ✓ представление о факторах риска, связанных с работой с вирусами и генетически измененными организмами;
- ✓ знание факторов риска, связанных с материалами, инфицированными микроорганизмами;
- ✓ представление о факторах риска, присущих биологическим материалам человеческого происхождения.

4. Аллергии

- ✓ представление о причинах возникновения аллергии;
- ✓ распознавание ранних признаков, указывающих на развитие аллергии.

5. Меры предосторожности и защита персонала

- ✓ знание соответствующего европейского и национального законодательства, а также местных мероприятий по гигиене труда и обеспечению безопасности персонала;
- ✓ осведомленность о программах по охране здоровья персонала, подвергающегося химической и биологической опасности;
- ✓ знание основных принципов гигиены и асептики;
- ✓ правильное обращение с защитными средствами и оборудованием (вытяжными шкафами, масками и т.д.);
- ✓ принятие необходимых мер предосторожности для максимального снижения потенциального риска.

6. Первая помощь

- ✓ знание местных мероприятий, проводимых при несчастном случае;

- ✓ представление о том, что может быть и что должно быть сделано до прибытия помощи.

7. Захоронение отходов и законодательство, направленное на охрану здоровья

- ✓ знание национального законодательства, связанного с окружающей средой и ее охраной;
- ✓ представление о местных мероприятиях по захоронению отходов;
- ✓ классификация различных видов отходов;
- ✓ правильная обработка материалов до их захоронения;
- ✓ знание местных мероприятий по правильному захоронению трупов животных.

Альтернативные пути достижения уровня компетентности категории В

Один из таких способов – прохождение отдельных курсов. В этом случае сложнее структурировать представленные материалы, а обучение практическим основам должно иметь индивидуальный подход. Такие курсы позволяют более эффективно использовать квалифицированных преподавателей.

Другая возможность – краткосрочные курсы повышения квалификации; в этом случае изучение теории сочетается с приобретением практических навыков непосредственно на рабочем месте.

Повышение уровня компетентности посредством непрерывного обучения

Любые знания, полученные в процессе обучения, если только они постоянно не используются и не совершенствуются, со временем устаревают. Должен существовать механизм, обеспечивающий поддержание компетентности на современном уровне в процессе дальнейшего соответствующего обучения. Государственные властные структуры, отвечающие за компетентность специалистов, должны поощрять выполнение этой задачи.

Оценка уровня компетентности

Присуждение признанного уровня компетентности недопустимо без тщательной оценки кандидата. В случае категории В необходима проверка не только теоретических знаний, но, даже в большей степени, полученных практических навыков. Дальнейшее обучение в соответствии с данными рекомендациями FELASA и результат, оцененный как успешный, должны подтверждаться дипломом, в котором будут подробно описаны теоретическая и практическая составляющие достигнутого уровня компетентности и который будет пользоваться европейским признанием.

Категория С – лица, ответственные за руководство экспериментами на животных

Ученые, ответственные за планирование или проведение экспериментов на животных, могут считаться компетентными специалистами при соблюдении двух требований:

1. Прохождение полного курса университетского образования с получением степени бакалавра или магистра (в зависимости от принятых национальных норм) или получение соответствующего образования по одной из биомедицинских дисциплин, таких как биология животных, медицина или ветеринария.
2. Прохождение основного курса по науке о лабораторных животных (не менее 80 часов) целиком или по частям, либо получение равноценного образования другим путем.

Базовое образование направлено на создание основы ответственного отношения к использованию животных и достижение высоких научных стандартов. Оно должно быть завершено до того, как ученый будет считаться компетентным для выполнения исследований на животных под свою ответственность. Дополнительные специальные знания по хирургии, отдельным методам и различным видам животных должны быть получены в тесном сотрудничестве с опытными исследователями и техниками по уходу за лабораторными животными или при посещении специализированных курсов. Лица, намеренные совершенствоваться в навыках и компетентном использовании с целью стать специалистами в области науки о лабораторных животных – категория D, являются объектом дальнейших рекомендаций. Лица, имеющие категорию D, очевидно, должны пройти дополнительное специальное обучение, о котором упоминалось выше.

Лицо, претендующее на получение категории С, должно обладать знаниями и практическим опытом в соответствии с темами, перечисленными в разделе «Уход и разведение животных» рекомендаций для 1-го уровня категории А:

1. Чистка, кормление и поение экспериментальных, разводимых и других животных.
2. Компетентность в обращении с традиционными видами лабораторных животных.
3. Ежедневное наблюдение и осмотр животных в соответствии с общими условиями содержания (включая отметку о принятии пищи/воды).
4. Выполнение некоторых методов эвтаназии в соответствии с детально разработанными процедурами.
5. Общее содержание помещений для животных.
6. Регистрация показателей среды в помещениях для животных и процедур, проводимых в этих помещениях.

Краткое изложение рекомендаций для категории С

- ✓ Минимальное требование к персоналу категории С – образование по биомедицинской дисциплине на уровне бакалавра или магистра,

а также прохождение основного курса объемом не менее 80 часов или равноценного в области науки о лабораторных животных.

- ✓ В базовое обучение должно быть включено 8 основных тем (подробное описание в приложенной программе):
  - а) биология и содержание лабораторных животных;
  - б) микробиология и болезни;
  - в) факторы риска для здоровья и безопасность работы в виварии;
  - г) планирование и проведение экспериментов на животных;
  - д) анестезия, анальгезия и экспериментальные процедуры;
  - е) альтернативы использованию животных;
  - ж) этические аспекты и законодательство;
  - з) анализ научной литературы.
- ✓ Лица, прошедшие курс обучения, по его окончании должны быть проверены в равноценных условиях, разработанных для других видов обучения.
- ✓ Соответствующим ведомствам Европейского Союза и Совета Европы рекомендуется разработать директивы в согласии с настоящими рекомендациями, обсудить вопрос о формировании комиссии экспертов для контроля над курсами в странах-участницах и обеспечения аккредитации данных курсов в случае необходимости. FELASA предлагает свою помощь в этой работе, что должно стать вкладом в гармонизацию, обучение и признание понятия «компетентное лицо» в соответствии с формулировкой Директивы Европейского Союза и Европейской конвенции.
- ✓ FELASA планирует привлечение и обучение квалифицированных инструкторов в области науки о лабораторных животных, составление реестра экспертов, и может обращаться за поддержкой в данной работе в ЕС и СЕ.
- ✓ Так как существует необходимость в учебном материале, FELASA хотела бы стимулировать и руководить подготовкой учебников, баз данных, видеофильмов и других визуальных материалов, а также собирать информацию по существующим курсам.

Программа обучения для категории С

ПРЕДЛАГАЕМЫЕ ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ

А. Биология и содержание лабораторных животных

1. Введение в науку о лабораторных животных, использование животных в различных областях исследований, история экспериментов на животных.

2. Биология лабораторных животных (сравнительная анатомия, физиология), воспроизводство и выращивание, уход и содержание, гомеостаз и стресс, благосостояние животных.
3. Этология (поведение) и обогащение среды.
4. Обращение с лабораторными животными и их транспортировка.
5. Питание, требования к питанию, состав диет, практика кормления, вариации состава диет и их влияние на состояние здоровья и результаты экспериментов, влияние добавок на прием пищи, преимущества и недостатки питания ad libitum.
6. Генетическая стандартизация; взаимодействия генотип–среда; инбредные линии; коизогенные, конгенные линии; трансгенные линии; рекомбинантные инбредные линии; гибриды F1, рандомбредные линии и аутбредные стоки; генетическая характеристика; контроль генетического качества; криоконсервация.
7. Распознавание, оценка и контроль боли, страданий и дистресса.

Б. Микробиология и болезни

1. Мониторинг здоровья и защита от болезней, карантин, гигиена, дезинфекция.
2. Гнотобиология; животные, свободные от определенных патогенных организмов (SPF); безмикробные животные; барьерное содержание; изоляторы; системы ламинарных потоков.
3. Болезни лабораторных животных, взаимосвязь заболеваний с экспериментами, последствия употребления лекарств.
4. Безопасность в работе с инфицированными животными.

В. Факторы риска здоровья и безопасность работы в виварии

1. Аллергия, зоонозы, патогенные организмы, карциногены, радиоактивные материалы, физические факторы риска и т.д.

Г. Планирование и проведение экспериментов на животных

1. Подготовка протокола эксперимента на животных; поиск литературы; выбор экспериментального животного (вид, линия, генетический статус, микробиологический статус); обеспечение животными и влияние транспортировки.
2. Модели на животных (спонтанные, индуцированные); возможности и ограничения экспериментов на лабораторных животных; экстраполяция на людей результатов экспериментов, проведенных на животных.
3. Планирование эксперимента (например, на основе факториального анализа по схеме латинского квадрата), power-анализ для вычис-

ления количества животных в контрольной и экспериментальной группах, статистический анализ и интерпретация результатов.
4. Надежная лабораторная практика (GLP).

Д. Анестезия, анальгезия и экспериментальные процедуры
1. Ознакомление с методами анестезии, анестетики и анальгетики, местные анальгетики и общие анестетики.
2. Выбор анестетика в зависимости от вида животного и характера эксперимента, видоспецифичные вариации при введении анестетиков, влияние анестетиков на результаты экспериментов.
3. Осложнения и уход за животными после эксперимента, безопасность и предосторожности.
4. Экспериментальные процедуры – демонстрация и практика; нехирургические процедуры, такие как инъекции, оральное введение, забор крови, мочи или кала; принципы хирургии, хирургический инструментарий, асептические методы, демонстрация некоторых хирургических процедур.

Е. Альтернативы использованию животных
1. Определение альтернатив; усовершенствование, замена или сокращение использования животных; обзор альтернатив; возможности и ограничения альтернатив; альтернативы в обучении и исследованиях.

Ж. Этические аспекты и законодательство
1. Отношение к животным, взаимоотношения человек–животное, истинная и инструментальная ценность животных, аргументы «за» и «против» использования животных в научных целях, дискуссия по этическим аспектам использования животных, комиссии по этике.
2. Законодательные аспекты; обзор национального и европейского законодательства, касающегося использования животных в научных целях; лицензирование; компетентные лица; инспекция; регистрация.

З. Анализ научной литературы
1. Анализ опубликованных работ; тщательная проверка выбора вида или линии животного, количества и спецификации используемых животных; планирование эксперимента, хирургических или других экспериментальных процедур; обсуждение целесообразности представляемой работы.

Курс завершается экзаменом или подтверждением квалификации в другой форме.

Директивы FELASA по образованию специалистов в области науки о лабораторных животных (категория D)

FELASA определяет категорию D как руководство лабораторией и специализацию более высокого уровня, как лица, чья квалификация и опыт позволяют выполнять по крайней мере следующие обязанности:
1) управлять всеми животными, человеческими и физическими ресурсами учреждения, где содержатся лабораторные животные;
2) создавать условия для здоровья и благосостояния животных;
3) оказывать в случае необходимости помощь и содействие исследователям, работающим с лабораторными животными, а также обеспечивать практическую поддержку научно-исследовательских программ;
4) обеспечивать соответствие деятельности всем законам, правилам и директивам, касающимся разведения, содержания и использования лабораторных животных, а также управления виварием;
5) нести ответственность за разработку и представление образовательных программ для внутреннего и внешнего пользования по гуманному содержанию и использованию лабораторных животных, продолжающих развитие концепции 3R [Russel & Burch, 1959];
6) содействовать дальнейшему развитию нововведенных концепций гуманного содержания и использования лабораторных животных, включая проводимые исследования в области науки о лабораторных животных.

Уровень обучения

Образование и обучение специалистов в области науки о лабораторных животных должно предлагаться в виде последипломного обучения.

Специфические требования

Основным требованием для получения дальнейшего образования в области науки о лабораторных животных должно быть наличие степени по биомедицинским или ветеринарным наукам или другой сертифицированной эквивалентной квалификации. Предполагается, что кандидат еще до начала курса обучения будет иметь соответствующий опыт в области науки о лабораторных животных.

Свидетельство об успешном окончании курса может быть получено только после сдачи экзамена или подтверждения квалификации в другом виде. Заключительная оценка или экзамен будут свидетельствовать о способности кандидата проводить научно-исследовательскую работу.

Примером такой оценки может быть:
1) публикация научной статьи в качестве главного автора на основе именно оригинального научного исследования (не истории болезни) в одном из рецензируемых журналов;

2) подготовленный определенным образом отчет в виде описания нескольких историй болезни;
3) разработка небольшого научно-исследовательского проекта и демонстрация использования научного метода (выполнение данного проекта в учреждении, имеющем непосредственное отношение к науке по лабораторным животным, не является обязательным условием).

Учебный план

Последипломное образование в области науки о лабораторных животных длится от одного года до четырех лет (см. таблицу). Данная рабочая группа рекомендует двухгодичное последипломное образование при обучении, занимающем полный рабочий день, или эквивалентное с частичной занятостью, предусматривающее рассмотрение всех тем и требований категории D. Оно должно включать шесть месяцев на подготовку научно-исследовательского проекта. Каждый из разделов от А до З должен преподаваться в аккредитованных учреждениях и контролироваться назначенным экспертом. В зависимости от имеющейся подтвержденной квалификации, образования или опыта может быть получено освобождение от части курса.

Подробный учебный план

А. Законодательство, благосостояние и этические аспекты

1. Законодательство

а) обзор международного законодательства и норм, касающихся использования животных
✓ *общее представление о данном предмете, поддержка важных действующих практик, например Конвенции по международной торговле исчезающими видами растений и животных (CITES), надлежащей лабораторной практики (GLP), обеспечение исторической перспективы;*

б) европейские законы (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 1986 г. и Директива Совета Европы 86/609)
✓ *содействие проведению дискуссий и консультаций по данному вопросу с учеными из других стран;*

в) национальное законодательство
✓ *обеспечение соблюдения учеными законов;*

г) процедуры регистрации и выдачи лицензий; компетентные лица; должностные лица, занимающиеся вопросами благосостояния животных; виварии; минимальная площадь пола в клетках и т.п.; поставка лабораторных животных и источники их получения; положения, регулирующие практическую деятельность
✓ *руководство учреждением в рамках юридических норм;*

д) надзор со стороны органов управления и комиссии по этике
✓ *осуществление юридического и этического надзора за вивариями и экспериментами на животных;*

е) альтернативы экспериментам на животных, выбор вида животных и их количества в группе (юридические аспекты)
✓ *наличие у специалистов хороших практических знаний и понимание возможностей и ограничений применения альтернативных методов*
✓ *проведение научной экспертизы аспектов, касающихся планирования исследований на животных.*

2. Благосостояние

а) филогенетические, генетические и онтогенетические аспекты поведения
✓ *понимание фундаментальных процессов, лежащих в основе поведения;*

б) изучение, коммуникация, социальная организация и взаимодействие с окружающей средой
✓ *получение знаний, необходимых для оценки встречающегося неадаптированного поведения и возможных его причин;*

в) этологические параметры как индикаторы основных требований к окружающей среде, обогащение окружающей среды и контроль экспериментальных переменных
✓ *развитие профессионализма и знаний, позволяющих принимать соответствующие корректирующие меры;*

Таблица 2

ОБУЧЕНИЕ В ОБЛАСТИ НАУКИ О ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (LABORATORY ANIMAL SCIENCE – LAS) В ЕВРОПЕЙСКИХ СТРАНАХ, ВКЛЮЧАЮЩЕЕ ТРЕБОВАНИЯ ДЛЯ КАТЕГОРИИ D

Учреждения, имеющие программы обучения	Основное образование	Продолжительность обучения	Степень/специальность в LAS
Факультет ветеринарной медицины, Миланский университет, Италия	А. Ветеринарное	А. Ветеринария/3 года	A. Diploma in Scienza e medicina dell'animale da faboratorio (диплом по LAS и медицине)
	Б. Другое биомедицинское (исследователь)	Б. Биомедицина/2 года	Б. Diploma in Scienza dell'animale da laboratorio (диплом по LAS)
Факультет ветеринарной медицины Льежа, Бельгия	А. Ветеринарное Б. Другое биомедицинское (исследователь)	2 года	Medicine Veterinaire Experimentale (экспериментальная ветеринарная медицина)

Несколько институтов/университетов, имеющих соответствующие отделения/виварии для проведения исследований в области науки о лабораторных животных, Германия	А. Ветеринарное	А. 3 года	А. Fachtierarzt für Versuchs-tierkunde (специалист-ветеринар в области LAS)
	Б. Ветеринарное	Б. 2 года	А. Fachtierarzt für Tierschutz (специалист-ветеринар по охране животных)
	Б. Ветеринарное, зоологическое и биомедицинское (исследователь)	В. 4 года	В. Fachwissenschafler für Versuchstierkunde (научный специалист в области LAS)
А. Королевский колледж ветеринарной хирургии, Соединенное Королевство	А. Ветеринарное, 2 года работы в области LAS	А. 1 год	А. Certificate in LAS (сертификат по LAS)
Б. Королевский колледж ветеринарной хирургии. Соединенное Королевство	Б. Ветеринарное, 5 лет работы в области LAS	1 год	В. Diploma in LAS (диплом по LAS)
Факультет ветеринарной медицины Утрехт, Нидерланды	А. Ветеринарное Б. Другое биомедицинское (исследователь)	1 год	Laboratory Animal Specialist Recognized by the government (специалист по лабораторным животным, сертифицированный правительством)
А. Департамент сравнительной медицины, Университет Уппсалы, Швеция	А. Общее биомедицинское	А. 2 года	А. MSc (Medicine) (магистр медицины)
Б. Виварий лабораторных животных, Норвежский колледж ветеринарной медицины, Норвегия	Б. Ветеринарное	Б. 3 года	В.. MSc (магистр)
Национальная ветеринарная школа, Франция	А. Ветеринарное и другое биомедицинское с опытом исследовательской работы в области LAS	1 год	
Ветеринарные факультеты в Берне и Цюрихе, а также сертифицированные коммерческие научно-исследовательские институты, Швейцария	Ветеринарное	4 года	Spezialtierarzt für Labortierkunde (диплом по LAS Швейцарской ветеринарной ассоциации)

г) поведенческие характеристики интактных и экспериментальных животных (экспериментальный стресс, спонтанные и индуцированные мутации)

✓ *приобретение навыков по установлению и диагностике нормального и измененного поведения;*

д) гомеостаз, способность к адаптации и ее ограничения, стресс и дистресс

✓ *понимание процессов, лежащих в основе стресса, его устранения и дистресса;*

е) патология поведения, здоровье

✓ *осознание того, что здоровье - это нечто большее, чем просто отсутствие болезни, боли и дистресса; проблемы при оценке состояния здоровья;*

ж) распознавание и оценка стресса и дистресса

✓ *получение знаний, позволяющих производить оценку случаев возникновения стресса и дистресса;*

з) контроль стресса и дистресса

✓ *развитие профессионализма и знаний, позволяющих принимать соответствующие меры*

3. Этические аспекты проведения экспериментов на животных

а) взаимоотношения между человеком и животными, исторические корни и религиозные аспекты, служащие примером развития библейских и греческих традиций; современные концепции — специсизм (безразличие к страданиям животных), эгалитаризм, права животных; антропо- и биоцентрический подходы

✓ *понимание различных основных этических позиций и их исторических корней*

✓ *закладка основы для вдумчивого исследования моральных ценностей, невзирая на личные моральные принципы*

✓ *поощрение чувства ответственности;*

б) внутренние ценности и моральные аспекты использования животных

✓ *формирование личной этической позиции;*

в) этический диалог и этическая аргументация, ловушки в аргументации, этика общения

✓ *развитие навыков моральной аргументации и правильного отношения к использованию животных;*

г) различия в философских и научных взглядах на происхождение жизни (библейская версия сотворения мира в сравнении с концепцией эволюции) и проблема взаимопонимания философов и ученых; конфликт между этическими принципами благоговения перед жизнью и использования человеком животных в целях самосохранения

✓ *эффективное влияние на политические решения и регулирующие деятельность законы*

✓ *создание основы для проведения дискуссий в этических комиссиях;*

д) модели этической аргументации и этического оправдания научно-исследовательских проектов; этические принципы и руководства, касающиеся проведения научных экспериментов на животных

✓ *убедительное отстаивание своей позиции при контактах с общественностью и средствами массовой информации.*

Б. Управление виварием и его ресурсами

1. Направление рабочих программ

а) развитие программ и практических руководств

✓ *соответствие требованиям высокого качества содержания лабораторных животных, их биологическим и другим потребностям;*

б) развитие структуры персонала

✓ *создание условий для выполнения всех административных, управленческих и технических функций;*

в) осуществление проверки

✓ *создание условий для регулярной оценки деятельности и ее проверки по мере необходимости.*

2. Прием персонала

а) стандарты, касающиеся квалификации и опыта

✓ *определение различных категорий труда;*

б) развитие трудовой иерархии

✓ *организация работы персонала и его взаимодействие, описание трудовых обязанностей и целей управления, а также обеспечение программ профессионального роста;*

в) критерии и рассмотрение эффективности труда персонала

✓ *обратная связь с персоналом и внедрение программ повышения производительности.*

3. Финансовый контроль

а) обеспечение бюджета

✓ *обеспечение достаточного распределения по отдельным статьям, организация процесса своевременной фиксации индивидуальных расходов;*

б) политика закупок

✓ *процедуры по проведению переговоров с поставщиками с целью заключения договора о наиболее выгодных ценах;*

в) оценка стоимости животных

✓ *включение закупочной цены, расходов на содержание и персонал, накладных расходов как необходимых для полного или частичного отчета.*

4. Стратегическое руководство

а) стратегия планирования

✓ *определение будущих потребностей и направления деятельности;*

б) влияние на политику и директивы учреждения

✓ *выполнение данных положений и оценка результатов политики и деятельности учреждения.*

5. Компьютеризированные системы управления

а) содержание животных и информационная система

✓ *содействие при заказе животных, проведение инвентаризации, хранение записей о состоянии здоровья животных и их истории, контроль качества и программы разведения;*

б) инвентаризация

✓ *обеспечение эффективного снабжения и использования оборудования и материалов;*

в) производственная бухгалтерия

✓ *учет окупаемости использования животных, сооружений и оборудования; развитие основ сдерживания роста издержек;*

г) контроль факторов окружающей среды

✓ *обеспечение их соответствия директивам, правилам и требованиям, касающимся благосостояния животных;*

д) системы, обеспечивающие соответствие использования животных требованиям законодательства

✓ *контроль за легальным использованием животных и сбор статистических данных по их использованию.*

6. Создание условий для обучения персонала

а) разработка и реализация программ

✓ *поддержка эффективной работы администрации, руководящего и технического персонала*

7. Связи

а) внутренние связи

✓ *обеспечение на должном уровне сервиса, руководство учреждением, хорошая осведомленность и понимание внутренних проблем;*

б) внешние связи

✓ *обеспечение хорошего понимания обществом потребностей учреждения, например формирование в обществе положительного восприятия организации; совершенствование внутренней деятельности на основе новой научной и коммерческой информации;*

в) связи с общественностью

✓ *овладение навыками общения с широкой общественностью по таким вопросам, как цели, методы и положительные результаты научных исследований.*

8. Сотрудничество с научным персоналом

а) обеспечение ресурсами

✓ *поддержка научных исследований и проведения экспериментальной работы, организация правильного ухода за животными, экспертизы, со-*

здание условий для оказания помощи в ходе эксперимента и обучения манипуляциям с животными;

б) проведение научных исследований

✓ *в сотрудничестве с другими учеными*

✓ *индивидуальная работа в какой-либо области науки о лабораторных животных и их благосостояния (см. также «Специфические требования» и «Учебный план»).*

9. Эксплуатация вивария

а) надлежащая гигиена в виварии

✓ *включение всех процедур, поддерживающих те функции, которые касаются удовлетворения биологических и других нужд животных, а также процедур, отвечающих требованиям персонала, осуществляющего уход за животными, исследователей и руководства;*

б) хранение материалов и оборудования

✓ *обеспечение целесообразного и регулярного снабжения и распределения;*

в) контроль и захоронение отходов

✓ *осуществление в соответствии с инструкциями;*

г) мониторинг и хранение записей

✓ *обеспечение эффективного проведения всех операций.*

10. Проектирование вивария

а) состав и деятельность конструкторской группы

✓ *работа с архитекторами, инженерами, топографами и геодезистами, консультантами по эксплуатации, представителями финансовых структур, администрацией и заказчиком;*

б) рассмотрение вопроса о местоположении и размещении вивария

✓ *учет характеристик окружающей среды, влияния внешних факторов и взаимодействия с другими участками внутри данной структуры;*

в) соображения, касающиеся животных

✓ *учет таких аспектов, как виды и количество животных, их разведение и(или) закупка, содержание животных и(или) проведение экспериментов, микробиологический статус животных и методы их содержания;*

г) соображения, касающиеся сооружения

✓ *основной принцип и тип конструкции; стоимость; детальное планирование и спецификация помещений вивария, вспомогательных структур и их функций; взаимосвязь между виварием и вспомогательными структурами; транспортное обеспечение; обслуживание; окружающая среда и ее контроль; программы содержания животных.*

11. Здоровье и безопасность

а) законы, инструкции и правила

✓ *обеспечение безопасности проводимых в виварии операций и их легального разрешения, охрана здоровья персонала.*

В. Биология лабораторных животных

1. Анатомия млекопитающих и других видов животных

а) общая анатомия

✓ *описание строения и функций основных органов и систем наиболее часто используемых видов животных;*

б) сравнительная анатомия

✓ *выбор наиболее подходящей модели на животных с точки зрения межвидовой экстраполяции данных.*

2. Физиология млекопитающих и других видов животных

а) общая физиология

✓ *знание механизмов и физических / химических принципов, лежащих в основе жизненно важных процессов;*

б) сравнительная физиология

✓ *выбор наиболее подходящей модели на животных.*

3. Иммунология

а) общие принципы

✓ *знание клеточных и биохимических компонентов иммунного ответа;*

б) животные с иммунодефицитом

✓ *характеристика наиболее используемых линий и видов.*

4. Сравнительная клиническая патология

а) преаналитические факторы

✓ *влияние забора образцов, обращения и хранения на результаты анализа;*

б) аналитическое оборудование и инструменты

✓ *выбор и подготовка наиболее подходящего лабораторного оборудования;*

в) наиболее важные гематологические параметры; показатели коагуляции, агрегации, химический состав крови и анализ мочи

✓ *выбор наиболее подходящих для контроля анализов;*

г) границы нормы: определение показателей нормы для различных видов животных и их колебания в зависимости от возраста, пола и линии

✓ *интерпретация аналитических данных и выбор наиболее подходящей модели на животных;*

д) программы контроля качества

✓ *обеспечение качества аналитических процедур и результатов.*

5. Посмертное обследование

а) вскрытие трупа

✓ *владение наиболее подходящими методами проведения аутопсии;*

б) макроскопическая патология

✓ *распознавание наиболее важных макроскопических изменений в органах и тканях;*

в) изъятие и фиксация органов

✓ *надлежащее обращение с образцами до их дальнейшего изучения;*

г) гистопатология и гистохимия
- ✓ *знание наиболее важных этапов и методов, используемых в гистопатологии и гистохимии.*

6. Различные аспекты сравнения с человеком

а) адсорбция, распределение, метаболизм, экскреция (adsorption, distribution, metabolism, excretion – ADME) и биологическая доступность экзогенных соединений
- ✓ *выбор модели на животных, наиболее подходящей для испытания определенных классов соединений;*

б) моделирование на животных патологических состояний человека
- ✓ *знание наиболее важных спонтанных и индуцированных моделей заболеваний человека;*

в) экстраполяция на человека данных, полученных на животных
- ✓ *понимание значимости экспериментальных результатов для здоровья человека.*

Г. Содержание, разведение и генетика

1. Содержание

а) системы размещения животных
- ✓ *обеспечение оптимальных условий и оборудования для содержания животных;*

б) обогащение окружающей среды
- ✓ *ее соответствие поведенческим и социальным потребностям.*

2. Микро- и макросреда

а) температура, относительная влажность, вентиляция, относительное давление воздуха и его фильтрация, освещение, шум и другие контролируемые факторы окружающей среды
- ✓ *понимание и практическое знание данных параметров и их контроль, поддержание факторов окружающей среды в режиме максимального соответствия потребностям животных и персонала, а также принятым нормам.*

3. Питание и кормление

а) составление диет
- ✓ *влияние различных параметров корма и аспектов кормления на животных и научное исследование;*

б) источники энергии, волокна, витамины, минеральные вещества и др.
- ✓ *определение потребностей организма в данных составляющих и соответствие им;*

в) режимы кормления
- ✓ *оценка различий между кормлением без ограничения, с ограничениями и кормлением, предполагающим определение потребления корма животным в ходе эксперимента;*

г) вариации в составе диет

- ✓ *основания для вариаций и связанные с этим проблемы;*

д) специальные диеты
- ✓ *потребности в различные периоды жизни (отъемыши, молодые и старые животные) и для достижения определенных научно-исследовательских целей;*

е) влияние копро- и цекофагии
- ✓ *понимание биологического влияния и связанных с этим проблем;*

ж) влияние диеты на результаты эксперимента
- ✓ *влияние избыточного и недостаточного кормления, состава диеты, а также социальной депривации;*

з) контаминанты и их контроль
- ✓ *обнаружение и контроль химического загрязнения и заражения микроорганизмами и паразитами;*

и) влияние методов стерилизации
- ✓ *сравнение преимуществ и недостатков термической, химической обработки, облучения и использования этиленоксида;*

к) храение и контроль качества
- ✓ *регулирование и регистрация температуры, влажности и вентиляции при хранении кормов; важность химического анализа.*

4. Подача воды

а) бутылки и устройства для автоматической подачи воды
- ✓ *определение преимуществ и недостатков использования различных систем;*

б) pH, жесткость, микробиологические и химические примеси
- ✓ *определение влияния на здоровье и результаты научных исследований;*

в) обработка и стерилизация
- ✓ *определение эффективности и стоимости;*

г) лишение воды
- ✓ *осведомленность об этологии, необходимости обеспечения водой, объеме потребления и влиянии на здоровье.*

5. Подстил

а) типы подстила
- ✓ *знание оптимальных требований, преимуществ и недостатков различных типов;*

б) загрязнители
- ✓ *осведомленность о влиянии на здоровье и результатах экспериментов;*

в) обработка, стерилизация и хранение
- ✓ *определение требований в зависимости от типа содержания;*

г) использование клеток со сплошным и сетчатым/щелевым полом
- ✓ *определение условий, при которых использование подстила нецелесообразно.*

6. Гигиена

а) вирусы, бактерии, грибки и простейшие

✓ *понимание влияние гигиены на микробиологическое окружение животных;*

б) химические примеси

✓ *оценка источников химического загрязнения среды обитания животных;*

в) чистка, дезинфекция и стерилизация

✓ *определение оптимальных условий обработки вивария, оборудования и вспомогательных средств при различных типах содержания животных;*

г) микробиологический, паразитарный и химический контроль

✓ *организация и осуществление программ мониторинга, необходимых для высококачественного содержания животных;*

д) захоронение отходов

✓ *определение и использование соответствующих методов, соблюдение регулирующих данную деятельность требований.*

7. Разведение

а) размножение позвоночных: циклы изменения репродуктивной системы, окружающая среда и стимулы; видовые, линейные и сублинейные различия

✓ *понимание теоретических и практических аспектов размножения;*

б) методы разведения; продуктивность; групп постоянного и временного скрещивания; отбора стока разведения; программы скрещивания, предъявляющие различные требования к животным (количество, возраст, пол и т.д.); генетические характеристики и схемы разведения (бэккросс, интеркросс, рандомбридинг, контроль чистоты инбредных линий, генетический контроль, влияние условий содержания и окружающей среды

✓ *получение теоретических и практических знаний, необходимых для выбора в различных ситуациях оптимального метода размножения*

в) статус здоровья животных в свете их разведения; влияние на продуктивность; методы оборудование, используемые для деконтаминации; содержание животных с определенным статусом здоровья; мониторинг здоровья

✓ *понимание важности состояния здоровья животных и знание методов, используемых для его поддержания и пригодных для уничтожения определенных патогенных организмов;*

г) организация и управление, анализ затрат

✓ *характеристика образовательных программ по организации вивария и эффективному и экономичному руководству.*

8. Генетика

а) введение, менделирующая наследственность, полигенные признаки

✓ *ознакомление с теорией генетики;*

б) аутбредная колония: определение, преимущества и ограничения, ведение аутбредных колоний, стандартизация, дрейф генов

✓ *правильное поддержание и разведение аутбредного стока;*

в) инбредная колония, гибриды F1; определение, преимущества и ограничения

✓ *содержание и разведение инбредных, рекомбинантных линий и гибридов F1;*

г) генетические модели заболеваний на животных: полигенные модели, полученные селекцией; спонтанные мутации; трансгенные и нокаутные животные (определение, чрезмерная экспрессия гена, гомологичная рекомбинация, экспрессия и трансмиссия гена, валидация модели); влияние генетического фона

✓ *знание различных методов создания генетических моделей на животных;*

г) контроль генетической стандартности: фенотип, пересадка кожных трансплантатов, биохимические маркеры, иммунологические маркеры, маркеры ДНК

✓ *создание программ генетического мониторинга и обработка полученных данных,*

Г. Микробиология и заболевания

1. Микробиология

а) специальный обзор бактериологии, паразитологии и вирусологии лабораторных животных; понятия, включающие классификацию (таксономию), физические аспекты, характеристики, строение и резистентность к внешним условиям (физическим, химическим, биологическим); условия размножения и выживания; методы определения, включая микроскопические, культуральные, серологические и анализ ДНК

✓ *понимание этиологии и отличий от инфекционных заболеваний; элементарное представление о возможных методах лечения, применяемых штатными ветеринарами;*

б) микробиологический статус различных категорий животных: гнотобиотические, безмикробные, свободные от определенных патогенных организмов и конвенциональные животные; модифицированные животные (облученные, трансгенные или др.); микробиологические процедуры; программы скрининга

✓ *знание гигиенического и санитарного статуса некоторых определенных категорий лабораторных животных и осознание взаимодействий между животными и внешними факторами.*

2. Заболевания

а) неинфекционные заболевания, обнаруживаемые у лабораторных животных: физические, химические, радиационные и другие повреждения; естественные физиологические нарушения (проблемы, возникающие при беременности, рождении, в результате драк между животными, возрастные проблемы); врожденные заболевания; иммунологические заболевания; онкогенез; расстройства алиментарного происхождения (перекармливание, голодание, дефициты и т.д.); экспериментальная или непредвиденная интоксикация; аномальное поведение: тик, членовредительство, поведение, связанное со стрессом; хирургическая патология

✓ *знание основ их этиологиии и отличий от инфекционных заболеваний, возможное лечение;*

б) инфекционные заболевания: болезни лабораторных животных; зоонозы, эпидемиология и специальные меры безопасности; общие и специфические симптомы отдельных заболеваний; диагностика; профилактика, лечение и его эффективность; особое внимание к индуцированным инфекционным заболеваниям

✓ *общее представление о стратегии выявления проблем, связанных со здоровьем, а также о методах диагностики основных заболеваний, определения возбудителей и соответствующих мерах, предпринимаемых штатным ветеринаром.*

3. Симптоматика клинических заболеваний

а) общие проявления: внешний вид, слабость, масса тела, температура, нарушения кожного покрова и т.д.; специфичные проявления со стороны различных систем организма: нервная система: боль, обмороки, парез, паралич; опорно-двигательный аппарат; сердечно-сосудистая и дыхательная системы; пищеварительная система; мочеполовая система; эндокринная система; показатели анализов, выходящие за пределы нормы, и соответствующие симптомы

✓ *общее понимание этиологии, симптоматики и влияния данных заболеваний на экспериментальные результаты;*

б) диагностика, принципы дифференциальной диагностики

✓ *понимание основ работы штатного ветеринара по контролю и ведению отчетности о статусе здоровья лабораторных животных, а также диагностике по клиническим проявлениям изменений состояния здоровья.*

Д. Планирование и реализация научно-исследовательских программ и экспериментов на животных

1. Определение цели исследования

а) обзор литературы

✓ *умение вести поиск в общих базах данных по биомедицине и ветеринарии (например, в MEDLINE, CAB-I, CSA, AGRICOLA) и специализированных базах данных (например, в PREX, T-BASE, TOXUNE)*

✓ *хранение литературы и организация поисковой системы;*

б) анализ необходимой информации и выдвижение гипотезы

✓ *отбор необходимой информации и определение цели и задач исследования на животных с учетом ограничений, обусловленных бюджетом, временем, оборудованием, оснащением и т.п.*

✓ *составление плана по проведению эксперимента на животных.*

2. Выбор модели на животных

а) разработка критериев

✓ *получение ясного представления о требованиях, предъявляемых к модели на животных, и учет аргументов за и против использования альтернатив;*

б) специфические характеристики видов и линий

✓ *поощрение поиска максимального соответствия между моделью на животных и требованиями эксперимента;*

в) требования к микробиологической стандартизации, животные с определенным микробиологическим статусом

✓ *представление о влиянии микробиологического статуса животного на результаты экспериментов;*

г) требования к генетической стандартизации, модели с определенной генетической характеристикой (см. также разд. Г8)

✓ *знание различных классов животных с определенной генетической характеристикой преимуществ и недостатков использования инбредных, коизогенных, конгенных, трансгенных линий, гибридов F1, аутбредных стоков и популяций гибридов;*

д) генетические модели в сравнении с индуцированными

✓ *общее представление о различных категориях моделей на животных;*

е) приобретение (закупка, транспортировка, видовые особенности, обусловленная окружающими условиями продолжительность адаптации, карантин)

✓ *знание практических и организационных аспектов приобретения животных для научных исследований;*

ж) видовые особенности требований к условиям окружающей среды

✓ *ознакомление с требованиями и потенциальными проблемами, возникающими при содержании в виварии животных различных видов*

✓ *представление о взаимосвязи между условиями содержания и благосостоянием животных.*

3. Планирование эксперимента

а) определение необходимого количества животных для экспериментальных и контрольных групп: power-анализ

✓ *понимание важности консультации со статистиком перед началом эксперимента, например для оценки валидности выборки и достоверности результатов, а также для принятия решения, одобрить данную гипотезу или отказаться от нее;*

б) выборка

✓ *выработка стратегии получения типичной выборки данной популяции;*

в) рандомизация; планы опытов по схемам рандомизированных блоков, кроссовера (перекрещивания), латинского квадрата (решетка-квадрат) и сплитплота (расщепленных участков)

✓ *ознакомление с различными подходами к планированию эксперимента в зависимости от поставленных задач;*

г) статистический подход

✓ *знание основ статистического анализа в экспериментах на животных и возможностей статистики в сокращении необходимого количества животных;*

д) экспериментальные переменные

✓ *их определение, описание, влияние на научные исследования и контроль статистическими методами.*

4. Воздействие на опытные и контрольные группы

а) экспериментальные процедуры (см. также разд. Ж)

✓ *оценка уровня дискомфорта и степени его влияния на благосостояние животных и результаты экспериментов;*

б) возможности усовершенствования

✓ *стимуляция поиска совершенствующих альтернатив;*

в) использование плацебо/симуляции

✓ *выбор соответствующей контрольной группы;*

д) анестезия/аналгезия/хирургия

✓ *подтверждение отличия ответа на воздействие от эффекта используемых анестетиков/анальгетиков или проводимой хирургической процедуры.*

5. Организационные и административные аспекты проведения экспериментов на животных

а) представление протокола на рассмотрение

✓ *знание основных принципов, принимаемых во внимание при подаче протокола на рассмотрение комиссии по этике или другой контролирующей организации;*

б) описание материально-технического обеспечения, компетентность персонала, сбор и обработка данных

✓ *получение информации, необходимой для эффективного проведения исследования, включая разделение функций между различными лицами, вовлеченными в эксперимент.*

6. Отчет о результатах эксперимента

а) устное представление исследования

✓ *представление научного доклада;*

б) подготовка манускрипта в соответствии с требованиями международного журнала соответствующего профиля

✓ *публикация результатов исследования.*

Е. Анестезия, анальгезия и эвтаназия

1. Физиология ноцицептивной чувствительности

а) периферическое восприятие боли

✓ *представление о современной концепции боли, видовых и индивидуальных различиях восприятия и ответа на острые и хронические болевые ощущения*

✓ *знание локализации болевых рецепторов в коже и тканях животных и химической медиации ноцицептивной активности;*

б) передача импульсов

✓ *знание видовых особенностей восходящих путей передачи болевых ощущений;*

в) периферические и центральные механизмы распознавания боли

✓ *представление о разнообразии нервных и эндокринных механизмов восприятия острой и хронической боли, путях модуляции входящих сигналов;*

г) болевой ответ

✓ *представление о нисходящих путях, местной и общей реакции на качественно и количественно различающиеся раздражители;*

д) реакция животных различных видов на боль

✓ *знание видовых и индивидуальных различий восприятия боли.*

2. Фармакология и фармакокинетика соединений, используемых для анестезии, анальгезии и эвтаназии

а) соединения, антагонисты, миорелаксанты

✓ *ознакомление с наиболее распространенными соединениями, их эффективностью и фармакокинетикой;*

б) видовые различия

✓ *иллюстрация широкого диапазона ответов на введение соединений;*

в) экзо- и эндогенные факторы, влияющие на фармакокинетику

✓ *учет влияния окружающей среды (например, циркадных ритмов, температуры) и субъективных факторов (например, вида, пола, состояния здоровья, пищевого статуса, возраста);*

г) влияние на системы органов

✓ *обращение особого внимания гомеостазу и патологическому влиянию;*

д) влияние на эксперимент
- ✓ *идентификация факторов, оказывающих влияние на результаты эксперимента;*

е) безопасность персонала
- ✓ *оказание особого внимания безопасности в отношении тератогенного и индуцированного ферментами воздействия, предупреждение приема препаратов персоналом (наркомании).*

3. Анестезия

а) оборудование
- ✓ *применение оборудования, обслуживание и безопасность;*

б) до- и посленаркозные процедуры
- ✓ *осуществление на практике и видовые особенности ухода;*

в) общий и балансированный наркоз
- ✓ *представление о теории и практике ингаляционного наркоза; анестезии, вызываемой инъецируемыми препаратами; принципах искусственной вентиляции легких;*

г) местная и региональная анестезия
- ✓ *понимание когда, где и как их следует проводить;*

д) проведение и контроль
- ✓ *оценка глубины наркоза и различных жизненно важных функций, поддержание показателей на уровне гомеостатического порога, предупреждение осложнений; действия в критических ситуациях.*

4. Анальгезия

а) оценка боли
- ✓ *распознавание и оценка этологических и жизненно важных показателей острой и хронической боли;*

б) благосостояние животных
- ✓ *см., разд. А2;*

в) цель эксперимента
- ✓ *идентификация факторов, оказывающих влияние на результаты эксперимента;*

г) последствия
- ✓ *представление о влиянии веществ на гомеостаз, заживление ран, поведение и т.п.; схемы введения препаратов;*

д) привыкание и толерантность
- ✓ *специальный учет наркотических веществ и схем введения препаратов.*

5. Эвтаназия

а) законодательство
- ✓ *знание правовых аспектов и европейских рекомендаций;*

б) этика, цели и благосостояние

- ✓ *рассмотрение моральных аспектов эвтаназии, причин умерщвления животных и наиболее гуманных методов проведения эвтаназии;*

в) страх и дистресс у животных
- ✓ *учет и минимизация реакций отвращения у животных;*

г) эмоциональное состояние лица, проводящего эксперимент
- ✓ *учет эмоционального состояния человека с рассмотрением в первую очередь зооцентрической точки зрения, обсуждение эстетических аспектов в сравнении с этическими;*

д) оборудование
- ✓ *ознакомление с его разновидностями, эксплуатацией, безопасностью и обслуживанием;*

е) метод
- ✓ *представление о видовых особенностях, легкости выполнения, надежности и эффективности, быстроты и необратимости, влиянии на систему органов и экономичности.*

Ж. Хирургия и экспериментальные процедуры

1. Хирургия

а) определение
- ✓ *понимание принципов и требований асептической техники, хирургии, предполагающей выживание организма или являющейся конечной процедурой, обширных и незначительных операционных процедур;*

б) подготовка к операции
- ✓ *оценка и проведение всех необходимых процедур по подготовке животного, места хирургического вмешательства, инструментов и оборудования, а также оперирующего хирурга, специализирующегося на проведении различных операций;*

в) анестезия
- ✓ *см. разд. Е;*

г) операционные осложнения
- ✓ *приобретение и использование необходимого регистрирующего оборудования для обнаружения и коррекции во время операции возможных осложнений (гипотермии, обезвоживания, кровотечения, изменений кислотно-щелочного равновесия);*

д) оперативные приемы
- ✓ *оптимальные линии надреза, обращение с тканями, гемостаз и закрытие раны у соответствующих видов животных.*

2. Уход за животными, нуждающимися в хирургическом вмешательстве

а) предоперационная подготовка
- ✓ *оценка соответствия животного предполагаемой процедуре, проведение надлежащей адаптации, акцентирование внимания на адекватной гидратации и воздержании от пищи в соответствии с требованиями;*

б) уход во время проведения операции

✓ *обеспечение и мониторинг правильного дыхания, адекватной деятельности сердечно-сосудистой системы, внутренней температуры тела, гидратации и других основных функций, когда это необходимо;*

в) послеоперационный уход и ослабление боли

✓ *контроль за полным соответствием предварительно намеченных и основанных на клинической оценке элементов требованиям по сведению до минимума заболеваемости и смертности*

✓ *проведение в случае показаний мероприятий по ослаблению боли.*

3. Специфические хирургические приемы

✓ *выполнение различных хирургических процедур, как ниже перечисленных, так и не вошедших в данный раздел;*

а) техники трансплантации, пересадка новообразований

✓ *представление об основах трансплантационного иммунитета: гистосовместимость, отторжение трансплантата и области, наиболее подходящие для трансплантации;*

б) искусственные имплантаты

✓ *оценка и пересадка наиболее часто используемых имплантатов (сердечно-сосудистых, стереотаксических, мочевых, желудочно-кишечных), знание основных принципов внешних соединений и телеметрических техник, основ ухода за трансплантатом;*

в) эндокриноэктомии

✓ *знание основ и овладение навыками по их проведению на соответствующих видах животных, включая специальные соображения и последующий уход.*

4. Введение соединений

а) обращение с животными и их фиксация

✓ *выполнение процедур с минимальным стрессом для животного и исследователя*

✓ *требования, методы и уход;*

б) общие аспекты

✓ *знание необходимых характеристик вводимых субстанций;*

в) пути введения

✓ *представление об энтеральном и всех парентеральных путях введения для соответствующих видов животных;*

г) техники введения

✓ *введение препаратов различными способами и оценка путей введения, вводимые объемы, видовые особенности.*

5. Забор образцов

а) места для забора

✓ *описание и оценка различных мест для забора образцов у разных видов животных;*

б) общие аспекты

✓ *знание количественных и качественных характеристик;*

в) методы забора жидких сред организма

✓ *забор крови, мочи и экскрементов, содержимого желудочно-кишечного тракта, семенной жидкости, спинномозговой жидкости, молока, перитонеальной жидкости и клеток, экзокринных жидкостей, бронхоальвеолярный лаваж.*

6. Разные техники

а) методы регистрации и физиологические данные

✓ *надежная регистрация показателей основных систем организма (например, сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной) как для наблюдения за пациентом, так и в научно-исследовательских целях;*

б) образование антител

✓ *ознакомление с методами получения антител, связанными и не связанными с использованием животных;*

в) методы перфузии

✓ *представление о перфузии in vivo (например, почек, кишечника) и с целью фиксации различных органов;*

г) фиксация

✓ *представление о требованиях к использованию, методах и необходимом уходе.*

Глава 4

Категорирование животных

Получение надежных и воспроизводимых результатов медико-биологического эксперимента можно достигнуть лишь при соблюдении стандартности всех его слагаемых и условий проведения. В этом смысле лабораторное животное является наиболее уязвимым звеном в системе медико-биологического эксперимента. Его состояние как живого объекта зависит от воздействия многочисленных как экзогенных, так и эндогенных факторов, влияние которых далеко не всегда бывает явным и легко регистрируемым. Среди них, прежде всего, следует отметить факторы инфекционной и инвазионной природы. Причем различные, в том числе даже патогенные представители вирусной и бактериальной флоры, не всегда вызывают клинически явную картину заболевания. Часто они протекают в латентной форме или же в виде носительства. В настоящее время актуальность приобретает так называемая оппортунистическая, эндогенная инфекция, активизирующаяся при иммунодефицитных состояниях.

Классификация животных-моделей

Достижение современного уровня медико-биологического исследования возможно лишь при унификации всех факторов, воздействующих на организм лабораторных животных путем строгой стандартизации как условий содержания, так и самих животных. Введение в мировую практику требований системы GLP (Good Laboratory Practice) для проведения доклинических испытаний лекарственных веществ предъявило еще более жесткие требования к проблеме стандартизации животных, состоянию их здоровья.

Основой этих критериев является принцип недопустимости носительства ряда патогенных и условно-патогенных агентов инфекционной

Таблица 3

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПО КАТЕГОРИЯМ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Категория	Характеристика	Метод получения	Барьер	Контроль	Использование
1	Конвенциональные (CV)	Случайный	Отсутствует (открытая система)	Стандарт 1 категории	В целях обучения (острые опыты)
2	Улучшенные конвенциональные(MD или Minimal Deseases)	От животных более высокой категории качества	Неполная барьерная система	Регулярный по стандарту 2 категории	Рутинные исследования в кратковременных экспериментах
3	SPF (СПФ или свободные от патогенной флоры)	От животных, содержащихся в изоляторах и ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система	Регулярный по стандарту 3 категории	Изготовление стандартных препаратов, испытание на токсичность препаратов Хронические эксперименты длительностью 6 мес.
4	SPF или СПФ Максимально свободные от условно-патогенной флоры	От гнотобиотных или безмикробных животных, ассоциированных с определенными микроорганизмами	Барьерная система высокой степени надежности	Регулярный по стандарту 3 категории, с использованием ПЦР	Получение культур клеток при производстве вакцин, поддержание штаммов бактерий и вирусов перевиваемых опухолей, испытание новых фармакологических средств, проведение фундаментальных исследований иммунитета, воспаления и т.д.
5a	Безмикробные (аксенные GF)	Гистерэктомия Свободный от любой или известной формы жизни микроорганизмов	Изолятор	Регулярный на наличие ассоциированных микроорганизмов	
5b	Гнотобиотные (категории GFX)	Используются для описания животных и систем, все формы жизни в которых известны	Изолятор со специальным контролем	Регулярный, с использованием ПЦР и др. специальных методов контроля	

и инвазионной природы: вирусов, бактерий, паразитов. Во многих странах разработаны стандарты различных категорий качества животных по состоянию здоровья. Они включают перечень возбудителей, носительство которых исключается. Чем выше категория качества животного, тем больше перечень недопустимых агентов. Однако стандарты различных стран не идентичны. *Единой международной классификации* лабораторных животных по категориям качества и соответствующих стандартов *не существует*. В связи с этим животные, именуемые как SPF (Specific pathogen free), не имеют четкой характеристики качества, и, полученные из разных источников, могут значительно различаться по своему статусу. В последние годы отмечается явная тенденция к унификации критериев качества животных и созданию единых стандартов. Примером могут служить разработки группы исследователей европейских стран: GV-SOLAS, FELASA.

Специалисты нашей страны совместно с зарубежными коллегами на основе мирового опыта также предприняли попытку создания требований к качеству лабораторных грызунов различных категорий, которые были приняты в 1989 г. на совместном совещании в Софии. Однако опыт работы по контролю состояния здоровья животных позволил видоизменить эти нормативы (Таблица 3).

Классификация основана на методе получения исходных для разведения животных, наличии и надежности барьера и глубине или уровне контроля статуса животного по соответствующему стандарту (требованию). Предлагается различать 5 категорий качества животных: конвенциональные, содержащиеся в открытой системе (категория 1); улучшенные конвенциональные, находящиеся в барьерной системе неполного типа. Исходными животными этой категории могут быть только животные более высокого класса качества (SPF). Эта категория качества животных соответствует категории, именуемой во многих странах MD (Minimal Deseases), или (категория 2); а также категории SPF-животные, содержащиеся в строгой барьерной системе (категория 3); гнотобиоты и безмикробные или аксенные животные, содержащиеся в изоляторах (категории 4, 5a и 5b).

SPF-животные-биомодели

Конвенциональные животные являются животными-носителями различных неизвестных микроорганизмов. Такие животные могут содержаться как в стерильных, так и в обычных условиях и являются потенциальными носителями патогенов.

Обычные лабораторные животные, используемые в биомедицинских исследованиях, – просто здоровые особи. Использовать в исследованиях животных-гнотобиотов практически невозможно ввиду их чрезвычайной дороговизны, объяснимой необходимостью его содержания в изоляторе.

Противоположностью этому являются SPF-животные, которые, с одной стороны, являются носителями целого ряда неизвестных видов микроорганизмов, но, с другой, – свободными от одного или нескольких специфических патогенных микроорганизмов.

SPF-животные, микробиологический статус которых подтвержден, являются более экономичной альтернативой гнотобиотам. Однако гнотобиотные технологии представляют наилучший способ развития базовой линии SPF-животных.

Производство SPF-животных выглядит следующим образом. Первоначально безмикробных животных с неразвитой системой иммунной защиты ассоциируют с «коктейлем» аэробных и анаэробных микробов-симбионтов. Эта непатогенная микрофлора способствует развитию системы иммунной защиты, которая в свою очередь позволяет животным выжить вне изолятора в условиях обычного содержания. Ожидается, что животное получит из окружающей среды дополнительно некоторые непатогенные организмы, что завершит или стабилизирует кишечную флору.

Здоровью колоний лабораторных животных постоянно угрожают инфекции. Невозможно ограждать колонии животных от вторжения нежелательных организмов вечно. Для того чтобы как можно дольше или, по крайней мере, до окончания эксперимента поддерживать здоровую популяцию животных, необходимы квалифицированные научные сотрудники и подготовленный персонал.

При надлежащем оборудовании и уходе можно поддерживать удовлетворительное состояние здоровья колоний SPF-животных на протяжении нескольких лет. Но даже в оптимальных условиях статус здоровья колонии будет постепенно снижаться и приведет к необходимости вновь создать популяцию животных из свежего биоматериала. Перед тем как приступить к воссозданию колонии, необходимо предварительно тщательно вычистить и продезинфицировать отсек, в котором содержались животные. Хорошо оснащенная и действенная шлюзовая система и навыки персонала являются основной гарантией снижения риска проникновения инфекции в отсеки размножения животных и содержания особей, предназначенных для эксперимента.

Как уже упоминалось ранее, для создания здоровой группы животных с подтвержденным микробиологическим статусом для получения племенного потомства требуются квалифицированные специалисты, оборудование и гнотобиотная технология. При проведении работ по возобновлению популяции лабораторных SPF-животных необходимо также наличие лаборатории, осуществляющей генетический контроль. Поскольку внут-

реннее пространство изолятора ограничено (и в него можно поместить лишь определенное количество пар для получения потомства), для воссоздания колонии необходимо отбирать животных с учетом генетического профиля имеющихся лабораторных линий и будущей колонии.

Гнотобиотные животные-биомодели

Гнотобиология (от греческих слов *gnotos*— известный и *bios* — жизнь) – раздел экспериментальной биологии, занимающийся получением и выращиванием стерильных животных (гнотобиотов), а также животных, микрофлора которых представлена одним или несколькими видами микроорганизмов. Гнотобиоты используются в ветеринарии для изучения болезней, сельскохозяйственных животных с невыясненной этиологией, а также для выяснения роли микробов в патогенезе многих болезней. На основе использования гнотобиологической техники проводятся работы по предупреждению инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: создаются стада животных типа СПФ (без специфических патогенных факторов). Хозяйства, включающие СПФ-стада, должны работать по типу закрытых предприятий со строгими ветеринарно-санитарными правилами режима хозяйства.

Безмикробные и гнотобиотические модели не являются альтернативой экспериментам с использованием обычных животных, это объекты, пригодные для специфических исследований.

Гнотобиология – это производство в научных целях биологических организмов – животных, растений и людей, наличие в которых полезных или нетипичных микроорганизмов полностью известно в пределах современной диагностики. Гнотобиотные животные могут быть:

безмикробными – то есть свободными ото всех видов микроорганизмов (вирусов, бактерий, грибков и паразитов), которые можно обнаружить современными методами диагностики;

моно-, ди- и полиассоциированными – в организме которых присутствуют 1, 2 или несколько видов известных микроорганизмов (изначально безмикробное животное, заселенное одним или более видом известных микроорганизмов).

Животные-гнотобиоты должны выращиваться в изоляторах. Изолятор должен обладать некоторыми обязательными признаками:

– внутренняя поверхность и содержимое безмикробного пространства, клетки или помещения должны быть выполнены из безмикробных материалов и в нем должна поддерживаться безмикробная среда;

– к внутреннему пространству изолятора и его содержимому должен быть обеспечен зрительный доступ;
– необходимо наличие специальных приспособлений для манипуляций внутри изолятора, а также для помещения в него гнотобиотного содержимого извне без риска нарушения гнотобиотных условий;
– должны быть оборудованы шлюзы для перемещения безмикробных животных и материалов в и из пространства без нарушения внутренних гнотобиотных условий;
– во избежание нарушения безмикробных условий должна быть оборудована вентиляционная система, позволяющая проветривать пространство помещения и создающая внутри него положительное давление.

Производство безмикробных млекопитающих возможно благодаря тому, что эмбрион в чреве здоровой матери является микробиологически стерильным. Незадолго до окончания беременности плод может быть асептично извлечен посредством гистерэктомии или кесарева сечения и помещен в стерильный изолятор. Молодняк может быть вскормлен в изоляторе безмикробной приемной матерью или искусственным молоком по составу приближенным к натуральному. Данная процедура на сегодняшний день редко используется в лабораториях для получения гнотобиотных мышей и крыс, поскольку они есть в продаже. Популяции гнотобиотов должны включать в себя достаточное количество особей репродуктивного возраста для поддержания генетического однообразия потомства.

Производственные масштабы, необходимые для поддержания стабильного приплода безмикробных крыс или мышей, выходит за рамки бюджета большинства исследовательских лабораторий.

Безмикробные животные иных видов, нежели мыши или крысы, должны выращиваться самим потребителем. Не представляет особой сложности получение безмикробных морских свинок, поскольку их детеныши достаточно развиты на момент появления на свет и не требуют длительного, а иногда даже и вовсе искусственного вскармливания. Низкие показатели выживания у кроликов. Кошек, собак и некоторые виды сельскохозяйственных животных можно вырастить безмикробными, но из-за их значительного размера они представляют трудности для длительного содержания в изоляторах.

Гнотобиоты-млекопитающие

Существуют оперативные и консервативные способы получения гнотобиотических животных первой генерации. Возможно, основу этим

работам составили наблюдения над особенностями развития новорожденных младенцев у человека и щенят, котят, мышат у животных.

Технологически для получения гнотобиотов применяются различные модификации гистерэктомии (сухой и влажной) и гистеротомии. В первом случае извлечение матки с эмбрионами производится в асептической среде, вне изолятора, с последующей ее перевязкой в области шейки, ампутацией и переносом через бактерицидный гидрошлюз в стерильное пространство камеры изолятора. В камере плоды извлекаются и освобождаются от плодных оболочек.

Во втором случае операция осуществляется с использованием операционного блока хирургического изолятора. Операция производится изнутри изолятора через пленку операционного блока и склеенные с ней кожные покровы живота беременной самки, с последующим извлечением плодов из беременной матки непосредственно в стерильное пространство камеры хирургического изолятора. Гнотобиоты необходимых инбредных линий могут быть получены путем одной из модификаций кесарева сечения с использованием лактирующей гнотобиотической самки для выкармливания новорожденных животных в изоляторе.

Из консервативных способов в литературе описаны методы получения гнотобиотов из взрослых особей путем обработки антибиотиками и антимикробными препаратами. Однако в настоящее время такой метод распространения не получил. В связи с коммерческой доступностью гнотобиотических животных различных видов и категорий получение племядер из коммерческих источников остается наиболее распространенным путем получения и последующего разведения гнотобиотов.

Методы получения *поросят-гнотобиотов* включают гистерэктомию и основаны на факте непроницаемости здоровой интактной плаценты для большинства микроорганизмов. В Центре разработаны методы получения и выращивания новой категории гнотобиотов — безантигенных животных, контролируемых по антигенам микробного и животного происхождения. Животные-гнотобиоты применяются для изучения некоторых аспектов респираторных болезней человека, приготовления тканевых культур, стандартных моноспецифических сывороток, изучения эффектов изменения стандартной микрофлоры, а также целого ряда иммунологических проблем.

С использованием хирургических изоляторов у свиней применялся также метод гистеротомии для получения безмикробных поросят. Безмикробные поросята и свиньи представляют особую ценность для исследований в области иммунобиологии и патологии, учитывая отсутствие у них трансплацентарной передачи иммуноглобулинов и антител материнского происхождения. Кроме того, благодаря морфофункциональным сходствам целого ряда систем (кровообращения, пищеварительного тракта, кожи, сердечно-сосудистой и др.) с аналогичными системами и органами у человека этот вид животных находит все большее применение в моделировании заболеваний человека. В экспериментах особую ценность представляют миниатюрные породы свиней. Первые методические приемы получения *безмикробных поросят* методом гистеротомии в России были отработаны в середине 70-х гг. в лаборатории биомоделирования НЦБМТ РАМН.

Морские свинки были первыми животными, полученными в безмикробном состоянии еще в 1895 г. Способность к активному образу жизни и самостоятельному питанию сразу после рождения дали возможность получения и выращивания животных этого вида. Однако выращивание безмикробных морских свинок до половозрелого возраста представляет серьезную технологическую проблему, связанную с подбором адекватных диет и устранением чрезмерного растяжения слепой кишки. Последний феномен, отмечаемый у безмикробных грызунов, в значительной степени проявлялся у этого вида гнотобиотов. Поэтому размножение морских свинок в безмикробных условиях удалось получить значительно позднее, чем безмикробных крыс и мышей. В России первые эксперименты с безмикробными животными также были начаты с получения первой генерации безмикробных морских свинок в Центре.

Как показали дальнейшие наблюдения, получение первой генерации *безмикробных морских свинок* целесообразнее непосредственно для экспериментальных исследований, чем осуществлять их воспроизведение в производственных масштабах. Получение гнотобиотических морских свинок осуществляется оперативными методами. Попытки получения гнотобиотических морских свинок *путем деконтаминации* к успеху не привели. Для оперативного получения безмикробных морских свинок используют хирургические гнотобиологические изоляторы или изоляторы, снабженные бактерицидным гидрошлюзом (для гистеротомии). Продолжительность беременности у морских свинок варьирует от 61 до 68 дней. При отборе беременных самок для операции ориентируются на объективные признаки: размягчение лонного сочленения, расхождение лонных костей на 20—22 мм.

Первые эксперименты по получению *безмикробных кроликов* были начаты в 40-х гг. XX века. В России модель безмикробных кроликов была впервые получена и применена в изучении патогенеза холерной инфекции и механизмов интоксикации в конце 70-х гг. в НЦБМТ РАМН. Принципиально методика оперативного получения первой генерации безмикробных кроликов мало отличается от таковой для морских свинок. Учитывая, что беременность у крольчих длится ровно 30 дней, отбор

беременных самок для операции трудностей не представляет. Обычно животных оперируют в последний день беременности. Для операции используются две модификации кесарева сечения: гистеротомия и гистерэктомия, но учитывая преимущество местной анестезии для выживания крольчат, предпочтителен метод гистерэктомии.

Работы по получению *безмикробных хомяков* были начаты в 1960 г. Безмикробных хомяков получают с помощью как оперативных методов, так и методами деконтаминации. Методика кесарева сечения у беременных самок хомячков подробно описана в литературе. Возможно перекрестное вскармливание новорожденных хомячков лактирующими самками других видов грызунов.

Методом селективной деконтаминации у сирийских хомячков можно освободить желудочно-кишечный тракт этих животных от кишечных жгутиковых и *Pasteurella pneumotropica*. Процедура включала введение с питьевой водой сульфата дигидростерптомицина (2 г/л), а также диметридазола (800 мг/л). Для устранения *P. pneumotropica* в защечные мешки животных вводили 0,5 мг пасты, состоящей из неомицина (27 мг/г) и дигидрострептомицина (27 мг/г). Подобная процедура продолжается 4 нед., после чего животных содержат в стерильных камерах с ламинарными потоками стерильного воздуха. Методика позволяет устранить аэробные, грамотрицательные бактерии, а также кишечные жгутиковые. Для более полной деконтаминации используют купание хомячков в бактерицидной ванне с последующим переносом в стерильный гнотобиологический изолятор. Смесь антибиотиков для деконтаминации включает (мг/100 мл): амфотерицин – 10, ампициллин – 50, бацитрацин – 500, хлорамфеникол – 100, колистинсульфат – 500, фузидин – 50, канамицин – 400, налидиксин – 500, неомицинсульфат – 500, пенициллин G – 100, полимиксин B – 25, стрептомицин сульфат – 250, тетрациклин – 50, триметоприм-сульфаметоксазол – 15, тилозинтартрат – 50. Методика позволяет выращивать деконтаминированных хомячков в течение ряда генераций.

Получение плотоядных лабораторных животных, к которым относятся *собаки* и *кошки*, в безмикробных условиях представляет особый интерес для экспериментальной медицины, и в частности таких ее разделов, как нормальная и патологическая физиология, инфекционная и неинфекционная патология, аллергология, токсикология, экспериментальная хирургия и др.

С середины XX века начаты работы по получению и применению в медико-биологических экспериментах *безмикробных обезьян.* Для получения их в безмикробном состоянии пользовались операцией гистеротомии у беременных самок павианов с использованием хирургического пленочного изолятора типа Трекслера. В подобных изоляторах осуществляли и их

последующее выращивание с использованием для искусственного вскармливания коммерческой диеты SMA, обогащенной железом, разведенной водой в соотношении 1:1,1. Через 1–2 дня обезьяны приучались к самостоятельному питанию. В возрасте 2 мес. гнотобиотические обезьяны переводились на брикетированный корм, смешанный с молоком. Опыт выращивания безмикробных обезьян в течение 10 мес. показал хорошие результаты.

Птицы-гнотобиоты

Методики получения гнотобиотов были также разработаны и адаптированы и в отношении других сельскохозяйственных животных и птиц. Описаны методы получения гнотобиотических ягнят, козлят, телят, свиней, а также гнотобиотических птиц (цыплят, перепелок, индеек, уток). Получение этих животных основано на тех же принципах, описанных и для лабораторных животных.

Получить *безмикробных птиц* относительно легко, но у них выше, чем у млекопитающих, риск случайного заражения. Процедура их получения детально описана. Яйца нужно брать от здоровых родителей во избежание риска инфицирования эмбриона на этой стадии. Наиболее частым источником заражения являются микроорганизмы, находящиеся под скорлупой и на ее поверхности, поэтому брать можно только яйца с абсолютно чистой скорлупой. Они помещаются в обычный инкубатор, но извлекаются оттуда за несколько дней до предполагаемого вылупления птенцов. Во время инкубационного периода яйца необходимо поддерживать в идеальной чистоте. Обращаться с яйцами можно только в перчатках, но мыть или скрести их нельзя, так как это может повредить их защитный слой. Инкубатор также должен быть тщательно вымыт и помещен в зону, очищенную от пыли.

За 2 дня до вылупления птенцов яйца помещают в изолятор, предварительно деконтаминировав их. На этой стадии яйца еще раз проверяют и выбраковывают те, на которых обнаружили пятнышки, трещинки или грязь. Их просвечивают и в изолятор помещают только оплодотворенные яйца. Обычно яйца помещают в шлюз, опрыскивают их 2% раствором перуксусной кислоты и оставляют на 30 минут. Лишь после этого они могут быть помещены в изолятор. Температура в изоляторе должна быть 37–38°C, при относительной влажности воздуха 70–80%. Увеличить влажность можно с помощью емкостей с водой или смоченных хлопковых ватных тампонов. Для контроля условий внутри изолятора туда помещают влажный и сухой термометры. В период вылупления необходимо поддерживать достаточный доступ воздуха в изолятор.

После вылупления изолятор очищают от скорлупы и дают птенцам пищу и воду. Они быстро учатся самостоятельно есть и пить. Тогда температуру в изоляторе снижают до 35°С и в течение двух недель постепенно доводят до комнатной. От перьев птиц и раскрошенной еды появляется большое количество пыли. Жидкие выделения и разлитая питьевая вода могут существенно повысить уровень влажности. Для поддержания влажности на комфортном уровне необходимо обеспечить хорошее проветривание изолятора. Выходные фильтры могут забиваться пылью и конденсированной влагой, в этом случае рекомендуется установить еще одну ступень механической очистки и влагопоглотитель. Вместо выходных фильтров можно использовать альтернативные приспособления.

Выращивать и поддерживать популяцию гнотобиотов и безмикробных животных дорогостоящее занятие. Гнотобиотехнология требует высокой и узкопрофильной специализации, наличие квалифицированного персонала и многообразия специального оборудования.

Иммунные ответы у гнотобиотов

Гнотобиологические модели важны в изучении истинно первичного иммунного ответа. Учитывая множественность антигенов, представление о первичном иммунном ответе, изучаемом в экспериментах на обычных (природно контаминированных) животных, справедливо подвергается сомнению, так как в большинстве случаев мы имеем дело с ранним вторичным иммунным ответом. Действительно, изучение ранней фазы онтогенеза иммунного ответа в присутствии уже имеющихся фоновых естественных антител у обычных, так называемых нормальных животных представляется методологически неверным. Одним из наиболее интересных объектов для таких исследований являются безмикробные поросята, в особенности лишенные антигенного воздействия. Систематические исследования онтогенеза иммунного ответа на безмикробных и безантигенных поросятах позволили понять пути развития и дифференциации иммунной системы в зависимости от антигенного воздействия. Но необходимо выделить антигензависимую стадию созревания мультипотентных некоммитированных Т- и В-клеток и антигензависимую стадию их дифференциации и пролиферации. В антигеннезависимой стадии индуктивная роль в стимуляции развития стволовых клеток в Т-клетки (в тимусе) и В-клеток (в бурсо-эквивалентных условиях) отводится микрохимической среде этих органов. В то же время поликлональные активаторы В-клеток не обладают стимулирующим эффектом на иммунологически «девственные» В-клетки, полученные от безмикробных поросят.

Исключение антигенной стимуляции проявлятся у безмикробных животных в недостаточном развитии лимфоидной ткани, клеточных и гуморальных факторов иммунитета. Лимфоидная ткань у них находится в том исходном состоянии, которое отмечается у новорожденных животных и на основе которого происходит ее дальнейшее развитие после первого контакта с микробными и другими антигенами при рождении животных. Эти различия выражены в лимфоидной ткани и лимфатических узлах, дренирующих органы и ткани, испытывающие наибольшее воздействие микроорганизмов, в частности кишечник. Так, если вес мезентериальных лимфоузлов у обычных мышей составляет около 134 мг/100 г веса тела, то у безмикробных такого же возраста этот показатель является в 3 раза ниже.

В корковом веществе тимуса безмикробных крыс отмечается пониженное содержание лимфоцитов и отсутствие плазматических клеток. Гистологическими исследованиями лимфоидной ткани показано намного меньшее количество зародышевых центров у безмикробных животных по сравнению с обычными. При цитологических исследованиях вторичных лимфатических органов у безмикробных поросят наличие плазматических клеток выявить не удавалось. Понижены у безмикробных животных и уровни сывороточных глобулинов, что объясняется сниженной антигенной стимуляцией по сравнению с обычными животными.

Для гнотобиотов характерно недоразвитие лимфоидной ткани в лимфоидных органах, дренирующих слизистые оболочки, контактирующие с микробной средой. Это проявляется в гипоплазии перибронхиальной лимфоидной ткани и пониженной ее лимфоцитарной инфильтрации. У безмикробных животных отмечается также пониженная масса подчелюстных лимфатических узлов. Соответственно установлены и отличия в содержании клеточных элементов в лимфоидной ткани безмикробных животных. Отношение их абсолютного числа у обычных и безмикробных мышей составляет: для плазмобластов – 12,3; больших лимфоцитов – 12,3; незрелых плазматических клеток – 14,4; зрелых плазматических клеток – 8,3; средних лимфоцитов – 3,7 и малых лимфоцитов – 3,0. Различия в лимфоидной ткани у обычных и безмикробных животных проявляются и в содержании иммунокомпетентных клеток. В лимфоузлах безмикробных животных особенно снижено количество больших и средних лимфоцитов, больших пиронинофильных и плазматических клеток.

Пониженные уровни иммуноглобулинов у безмикробных животных не означают снижения иммунокомпетентности лимфоидной системы и ее способности к иммунному ответу. Образование антител у безмикробных животных наблюдается уже через 48 ч после антигенной стимуляции. После ассоциации гнотобиотических мышей с гексафлорой у последних

отмечалось повышение концентрации сывороточных IgGl, IgG2a и IgA, причем уровни IgA и IgGl даже превышали соответствующие значения у обычных животных.

У безмикробных поросят в возрасте 1,5 мес. установлены резко сниженные уровни иммуноглобулинов классов М и G, в то время как уровни IgA были одинаково низкими в сыворотке крови как у безмикробных, так и обычных поросят. Эти показатели у гнотобиотов повышались более чем в 2 раза после моноассоциации с непатогенной кишечной палочкой Escherichia coli 083. Особенно высокие уровни IgG, не отмечавшиеся у безмикробных животных, выявлялись у гнотобиотических поросят, моноассоциированных с непатогенными микроорганизмами *Bifidobacterium bifidum*. Показатели сывороточных фракций глобулинов и агглютининов у безмикробных животных в 1,5–3 раза ниже, чем у обычных животных. В лимфоидных элементах слизистой оболочки кишечника синтеза иммуноглобулинов не выявлено, в то время как у обычных животных, а также у гнотобиотических мышей после конвенционализации отмечается секреция в просвет кишечника иммуноглобулинов, в основном IgA-класса.

В НЦБМТ РАМН исследовалось влияние инсулина (1 ед/100 гр. веса в день, в течение недели) на формирование иммунного ответа на эритроциты овец (ЭБ; 50% взвесь по 0,1 мл под подошвенный апоневроз обеих лапок) у крыс линии Wistar и крыс-гнотобиотов. В качестве контроля использованы крысы обеих групп (без инсулина).

На 3-й и 7-й день после иммунизации ЭБ в лимфоузлах и селезенке исследовали число РОК и АОК на 10^3 ядерных клеток, коэффициент плазматизации лимфоузлов и уровень гемагглютининов в крови. Результаты показали, что фоновая активность Т- и В-систем у интактных гнотобиотов несколько ниже, чем у Wistar (по числу РОК и АОК). У контрольных гнотобиотов на 3-й день после иммунизации ЭБ число РОК в лимфоузлах и селезенке было достоверно меньше (27,8+2,9 и 37,0+1,1), чем у Wistar (соответственно 45,0±1,8 и 50,1+2,1; $P<0,01$). На 7-й день эти величины несколько выравнивались. У крыс, получавших инсулин, во все сроки наблюдения (в обеих группах) в лимфоузлах и селезенке их число резко (вплоть до полного исчезновения) уменьшалось.

Число АОК на 10^3 ядерных клеток у гнотобиотов также было меньшим на 3-й день (в лимфоузле – 44,3+2,2, в селезенке – 52,3+2,2), чем у Wistar (58,0+2,6 и 67,8+2,1; $P<0,01$). Введение инсулина значительно увеличивало число АОК в лимфоузлах и селезенке крыс обеих групп: на 3-день у крыс Wistar их число в селезенке было равно 96,1+7,1, в лимфоузлах – 178,0+10,9 ($P<0,01$); у гнотобиотов соответственно 80,0+ 8,2 и 71,7+6,0 ($P<0,01$ в сравнении с контрольными данными). На 7-й день опыта у крыс Wistar, получавших инсулин, сохранялось увеличение числа

АОК в лимфоузлах и селезенке (в сравнении с контролем $P<0,01$), тогда как у гнотобиотов их число уменьшалось.

В лимфоузлах развивалась пролиферация клеток плазматического ряда, а в крови выявлялись гемагглютинины. Однако их различие у гнотобиотов и контрольных крыс было несущественным. Кроме того, у гнотобиотов по сравнению с контролем на 7-й день после иммунизации под влиянием инсулина происходит отчетливое угасание иммунного ответа, тогда как у крыс Wistar стимулирующий эффект на гуморальное звено сохраняется отчетливым ($P<0,01$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что инсулин тормозит клеточное звено иммунитета и стимулирует гуморальное, хотя механизм такого эффекта инсулина до конца не выяснен, тем не менее, можно констатировать, что по интенсивности формирования иммунного ответа крысы-гнотобиоты значительно уступают таковому у интактных животных.

Глава 5

Мониторинг здоровья лабораторных животных

Оценка качества лабораторных животных в процессе содержания и эксперимента должна включать в себя микробиологический и генетический контроль, контроль внешней среды, заключающийся в мониторинге температуры, влажности, освещения, шума и т.д. и контроле питания.

Использование животных низкого качества может привести к необходимости увеличения количества животных для проведения эксперимента и даже полностью исказить результаты опыта.

В Руководстве приведены некоторые важные для экспериментаторов данные, касающиеся здоровья лабораторных животных. Более полную информацию по этому вопросу можно найти в монографии Н.Н.Каркищенко «Основы биомоделирования».

Контроль качества животных и учет

В соответствии с *Европейской конвенцией* по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы. Страсбург, 2004 г.), следует придерживаться нормативов содержания лабораторных животных.

В особых случаях для молодых или голых особей может требоваться содержание при более высоких температурах. Все ввозимые в страну животные должны пройти карантин согласно национальному законодательству. Сроки карантина в условиях лаборатории обычно определяются соответствующим лицом исходя из обстоятельств, этим лицом обычно является назначенный учреждением ветеринар.

Контроль качества должен проводиться на основе использования стандартных процедур обращения с животными, касающихся размещения, питания, физического обращения, ухода и контроля состояния здоровья. Должны учитываться следующие факторы: размер клеточного оборудования, количество животных в одной клетке, методы их удерживания и перемещения, а также используемая система разведения. Другой важной переменной для качества животных является кормление. Основные показатели кормления должны быть проанализированы и зафиксированы для каждого эксперимента. Дополнительно следует проверять корм на наличие химического загрязнения.

Микробиологический статус животного также является определяющим для результатов эксперимента. Агенты, в обычных условиях не вызывающие заболеваний, могут вызвать *проблемы* в ходе проведения эксперимента *из-за стресса*, испытываемого животными. Другие агенты, как, например, лактатдегидрогеназа вируса мышей может не вызвать заболевания в процессе эксперимента, но исказить его результаты. Учитывая это, желательно использовать как можно более «чистых» лабораторных животных, с известным микробиологическим статусом.

Генетический профиль лабораторных животных может быть крайне важным для успеха эксперимента. Учреждения, занимающиеся лабораторным животноводством, должны уделять особое внимание генетической чистоте животных. В рамках этих учреждений должны действовать программы по предотвращению генетического загрязнения линий по вине человека или в результате случайного спаривания, и раннему выявлению мутаций. Каждая линия имеет особый генетический профиль, определить который можно с помощью биохимических, иммунологических и морфологических маркеров. Желательно проводить предварительный генетический контроль до начала эксперимента.

Важно вести письменный учет процедур, проводимых с животными; обычно для этих целей заводится специальный журнал. В журнал должны заноситься записи о ежедневных наблюдениях, проводимых процедурах и другая текущая информация. Следующие рекомендации, содержащиеся в Правилах лабораторной практики, желательно использовать для обеспечения контроля качества животных и ведения журнала.

В организации должны быть приняты стандартные правила обращения с животными, включая содержание, питание, удерживание и перемещение и уход:

- ✓ все новые животные, полученные из внешних источников, должны быть изолированы и пройти процедуру карантина согласно ветеринарным требованиям;
- ✓ на начало проведения доклинических испытаний все животные должны быть здоровыми и не являться носителями агентов, способных повлиять на результаты исследования. Если в ходе экспери-

мента животное заболело или стало носителем какого-либо агента, его необходимо изолировать. Данные животные могут получать лечение, если оно не повлияет на результаты исследования. Результаты диагностики, назначенное лечение и его описание, а также даты проведения лечения должны быть документированы и сохранены;

- ✓ теплокровные животные, за исключением грызунов, еще питающихся молоком матери, используемые в лабораторной практике, которых требуется вынимать из клетки, должны быть соответствующим образом идентифицированы (татуировкой, цветным кодом, сережкой, кольцом на ноге и т.д.);
- ✓ вся информация, необходимая для идентификации особи, размещенной вместе с другими животными, должна быть доступна в местах содержания этих животных;
- ✓ при необходимости животных различных видов содержат в разных помещениях. Животные одного вида, но участвующие в различных экспериментах, обычно также содержатся в разных помещениях во избежание искажения результатов эксперимента. Если же их смешение необходимо, должны быть приняты меры для их адекватной дифференциации;
- ✓ клетки, стеллажи и дополнительное оборудование должны очищаться и стерилизоваться с достаточной периодичностью;
- ✓ вода и корм для животных должны периодически проверяться для того, чтобы удостовериться, что уровень их естественного загрязнения не превышает показателей, определенных в протоколе, выше которых загрязнение может повлиять на результаты эксперимента. О результатах проверки должны проводиться записи;
- ✓ подстилки, находящиеся в клетках и загонах, не должны влиять на результаты исследования. Менять их нужно по мере необходимости для обеспечения животному сухости и чистоты;
- ✓ если используются какие-либо препараты против паразитов, об этом необходимо делать запись в журнал. Препараты, способные повлиять на результаты исследования, не используются.

В Таблицах 4–6 приводится перечень вирусов, бактерий и паразитов для индикации у лабораторных мышей и крыс, носительство которых исключается в соответствии с категорией. Причем каждая более высокая категория включает также весь перечень агентов, указанных для нижестоящей.

В Таблицах 7–10 приводится перечень вирусов, бактерий и паразитов, не допустимых для носительства у морских свинок, хомяков и свиней 1 и 2 категорий.

Таблица 4

ПЕРЕЧЕНЬ ВИРУСОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ И КРЫС

Категория	Мыши	Крысы
I	Ectromelia virus Lymphocyttc choriomeningitis virus (LCM) Hantaan virus	Pox virus LCM Hantaan virus
II	Аналогично категории I	Аналогично категории I
III	Sendai virus Ротавирус мышей (EDIM) Вирус гепатита мышей (MHV) Вирус пневмонии мышей (PVM) Реовирус тип 3 Аденовирус мышей вирус Theiler (GD VII)	Sendai virus PVM corona virus у крыс(RCV) Sialodacryoadenitis (SDA) Реовирус тип 3
IV	Minute virus of mice (MVM) Вирус полиомы мышей Lactic dehydrogenase virus (LDV) K virus мышей cytomegalovirus мышей (MCMV)	вирус Theiler вирус Kilham у крыс (KRV) вирус Toolan (H-l)

Таблица 5

ПЕРЕЧЕНЬ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ И КРЫС

Категория	Мыши	Крысы
I	Salmonella spp. Listeria monocyto-genes Streptobacillus moniliformis Leptospira spp.	Аналогично
II	Аналогично категории 1	Аналогично
III	Bordetella bronchiseptica Pasteurella spp. Corynebacterium murium (Kutscheri) Mycoplasma pulmonis, neurolyticum arthritidis Bacillus piliformis Streptococcus pneumoniae Streptococcus gr. A,B,C,D,S,Y Chlamidia Helicobacter pylori	Аналогично
IV	Pseudomonas aeruginosa Staphylococcus aureus Citrobacter freundii Klebsiella pneumoniae Proteus spp. Escherichia coli Clostridium perfringens	Аналогично

Как видно из таблиц, у животных 1-й и 2-й категорий исключается носительство возбудителей, общих с человеком (антропозоонозы), у 3-й и 4-й – представителей патогенной и условно-патогенной флоры.

Стандартность животных определяется мониторингом их статуса в соответствии с категорией. Регулярный мониторинг осуществляется с минимальной частотой: для животных 1–2 категорий – 1 раз в 6 месяцев; для 3-4 категорий – 1 раз в 2–3 месяца; для 5 категорий – 1 раз в 6 месяцев.

Для контрольного обследования животные отбираются отдельно из каждой зоны обитания (корпуса). Минимальная выборка должна составлять не менее 10 животных, из которых 5 – в возрасте 10–12 недель, 5 – в возрасте старше 6 месяцев. При наличии у животных клинических

Таблица 6

ПЕРЕЧЕНЬ ПАРАЗИТОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ У ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ И КРЫС

Категория	Мыши	Крысы
I	Sarcoptes sp. Pathogene dermatophytae Toxoplasma gondii	Sarcoptes sp. Pathogene dermatophytae Toxoplasma gondii
II	ARTHROPODS Myobia musculi Myocoptes musculinus Nosopsyllus fasciatus Leptopsylla segnis Polyplax sp. Radfordia sp. Psorergates simplex	ARTHROPODS Notoedres muris Radfordia sp. Nosopsyllus fasciatus Leptopsylla segnis Polyplax sp.
	HELMINTHS Cestodes Hymenolepis sp. Hydatigera taeniaeformis larva (Strobilocercus fasciolaris)	HELMINTHS Cestodes Hymenolepis sp. Hydatigera taeniaeformis larva (Strobilocercus fasciolaris) Multiceps serialis larva (Coenurus serialis)
III	Nematodes Aspiculuris tetraptera Syphacia obvelata Syphacia muris Strongiloides ratti Capillaria hepatica Trichuris muris	Nematodes Aspiculuris tetraptera Syphacia obvelata Syphacia muris Strongiloides ratti Capillaria hepatica Trichuris muris Trichosomoides crassicauda
	PROTOZOA Trichomonas muris Hexamita muris Giardia muris Chilomastix bettencourti Coccidiae Eimeria sp. Criptosporidium muris Hepatozoon muris	PROTOZOA Trichomonas muris Hexamita muris Giardia muris Chilomastix bettencourti Coccidiae Eimeria sp. Hepatozoon muris
IV	Encephalitozoon cuniculi	Encephalitozoon cuniculi

признаков болезней выборка определяется эпизоотической ситуацией. При этом обязательно патогистологическое исследование.

Мониторинг проводится специалистами контрольно-диагностической лаборатории с использованием быстрых и надежных современных методов индикации инфекционных агентов. По результатам мониторинга определяется категорийность животных.

Таблица 7

ПЕРЕЧЕНЬ БАКТЕРИЙ, ВИРУСОВ И ПАРАЗИТОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ У МОРСКИХ СВИНОК

Категории	Бактерии	Вирусы	Паразиты
I	Salmonella sp. Leptospira sp. Mycobacterium tuberculosis bovis, avium Yersinia pseudotuberculosis Listeria monocytogenes Streptobacillus moniliformis Erysipelothrix rhusiopathiae	LCM	Sarcoptes scabiei Pathogene Dermatophytae Toxoplasma gondii
II	Аналогично категории I	PVM Reo Type 3 Sendai Theiler virus (GDVII) Simian virus 5	Облигатно паразитирующие артроподы (arthropods): Gliricolla porcelli Gyropus ovalis Все стадии цестод (cestodes) Echinococcus hydatidosus Трематоды (Trematodes): Fasciola hepatica Dicrocoelium lanceolatum

Таблица 8

ПЕРЕЧЕНЬ БАКТЕРИЙ, ВИРУСОВ И ПАРАЗИТОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ У ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯЧКОВ

Категории	Бактерии	Вирусы	Паразиты
I	Salmonella sp. Leptospira sp. Mycobacterium tuberculosis, bovis, avium Yersinia pseudotuberculosis Listeria monocytogenes Erysipelothrix rhusiopathiae	LCM	Sarcoptes scabiei Pathogene Dermatophytae Toxoplasma gondii
II	Аналогично категории I	PVM Reo Type 3 Theiler (GD VII) SV-5-Simian virus 5	Облигатно паразитирующие артроподы (arthropods): Demodex sp. virus Notoedres sp. Все стадии цестод (cestodes): Hymenolepis sp.

Таблица 9

ПЕРЕЧЕНЬ ВИРУСОВ, БАКТЕРИЙ И ПАРАЗИТОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ У ЗОЛОТИСТЫХ ХОМЯЧКОВ СПФ-КАТЕГОРИИ

Вирусы Viruses	Бактерии Bacterias	Паразиты Parasites
Lymphocytic choriomenineitis virus (LCM)	Bacillus piliformis	Грибы – Fungi
Thener's virus (GD VII)	corynebactenuni munum (Kutschen. Pseudotubercuiosis murium)	cryptococcus neo formans
Reo virus type 3	Pasteureila multocida	спирохеты splrochaetea
sendai virus или parainfluenza 1 virus		Простейшие -protozoa
Cytomegalo virus (herpesvirus)	Pasteureila pneumo-tropica (nomen dubium)	Toxopiasma gondii
Mouse adenovirus	salmonella sp.	гельминты Helminths
Leukaeroia virus complex: a. Hamster virus-c b. Bernhard virus c. Moloney virus Mouse sarcoma virus msv (Moloney) (M)	Pseudomonas aerueinosa	syphacia SP
	Klebsieila pneumonae	Trichosomodis nasasli
Polyoma virus	Streptococcus sp.	Hymenolepis sp.
Pneumonia virus у мышей (PVM)	Staphylococcus aureus	членистоногие -Arthropods
Polyoma virus	campylobacter sp.	Demodex sp.
sv-5 (paramyxovirus)	Proteus sp.	Notoedres sp.
H-l virus (Toolan virus)	Mycoplasmas Leptospira sp.	Sarcoptes scabiel

Таблица 10

ПЕРЕЧЕНЬ ВИРУСОВ, БАКТЕРИЙ И ПАРАЗИТОВ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ У СВИНЕЙ КОНВЕНЦИОНАЛЬНОЙ КАТЕГОРИИ

Вирусы Viruses	Бактерии Bacterias	Паразиты Parasites
Aphthae virus Picornovirus O, A, C, SAT-1, SAT-2,SAT-3,Asia-l)	Erysipelothrix insidiosa	Toxoplasma gondii
Вирус гриппа африканских свиней (iridovirus) Вирус гриппа свиней (Thogatoviras) Visicular exanthema virus	Leptospira SP.	Balantidinum coil Malstrem

Унификация критериев оценки состояния здоровья лабораторных животных и стандартизация их при постоянном мониторинге статуса дает возможность получения надежных и сравнимых результатов медико-биологических экспериментальных исследований.

В Таблицах 11—13 приведены инфекции цыплят, потенциально опасные для животных и человека и искажающие результаты экспериментальной работы.

Таблица 11

ПЕРЕЧЕНЬ НАИБОЛЕЕ ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПТИЦЫ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ИСКАЖАЮЩИХ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Возбудитель	Заболевания	Биориск заражения для человека и животных	Пути заражения	Контагиозность, симптоматика и исход. Влияние на результаты экспериментов
Marek's disease herpesvirus (MD-V)	Болезнь Марека	Цыплята, индейки, фазаны и др. виды животных	Воздушно-капельный	Антитела в желтке, высококонтагиозное заболевание и смерть
Infectious laryngotracheitis virus (ILT, herpesvirus)	Инфекционный ларинготрахеит	Цыплята, фазаны	Воздушно-капельный	Антитела в дейтериоплазме, высококонтагиозное заболевание
Egg drop syndrome virus (EDS, adenovirus)	Снижение яйценоскости	Цыплята	Оральный	Возможны антитела и вирусы в яйцах
Infectious bronchitis virus (IB)	Инфекционный бронхит	Цыплята	Воздушно-капельный	Возможны вирусы в яйцах или антитела в желтке, высококонтагиозное заболевание
Avian encephalitis virus (AE, picornavirus)	Энцефаломиелит	Цыплята, фазаны	Через яйца, оральный	Вирусы – в яйце, антитела – в желтке, высококонтагиозное заболевание, смерть цыплят
Newcastle Disease virus (NDV, paramyxovirus)	Болезнь Ньюкастла	Цыплята, фазаны, многие виды птиц, человек	Воздушно-капельный, оральный	Антитела – в желтке, возможны вирусы в яйцах, высококонтагиозное заболевание, смерть
Infectious bursitis virus (non-classified RNA virus)	Инфекционный бурсит	Цыплята	Оральный	Антитела – в желтке, вирусы – в желтке, высококонтагиозное заболевание, смерть цыплят
Avian leucosis virus (ALV)	Комплекс лейкозов: лимфоидный лейкоз, миелобластоз, эритробластоз, саркоматоз, остеопетроз	Цыплята, фазаны, в редких случаях другие виды птиц	Воздушно-капельный	Вирусы – в яйце, антитела – в яйце, высококонтагиозное заболевание, смерть

1	2	3	4	5
Fowl-pox virus (pigeon-, canary-, chicken-, pheasant-, quail- или Agapornidae-pox в зависимости от вида поражения)	Оспа птиц	Цыплята (другие виды птиц в зависимости от штамма вируса)	Кожный	Наличие антител и вирус в яйце точно не доказано, высококонтагиозное заболевание
Avian influenza A virus (orthomyxovirus)	Не определенные заболевания	Цыплята, гуси, индейки, фазаны и др. виды птиц	Воздушно-капельный, оральный	Антитела – в желтке, возможно наличие вирусов в яйце, высококонтагиозное заболевание
Paramyxovirus Parainfluenza virus 2 и 3	Не определенные заболевания	Цыплята, индейки, различные виды птиц и млекопитающих, человек	Воздушно-капельный	Синдром пониженного всасывания, артрит, тендосиновиит, миокардит у гусят

Таблица 12

ПЕРЕЧЕНЬ НАИБОЛЕЕ ОПАСНЫХ МИКОПЛАЗМЕННЫХ И БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПТИЦЫ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ИСКАЖАЮЩИХ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Возбудитель	Заболевания	Биориск заражения для человека и животных	Пути заражения	Контагиозность, симптоматика и исход. Влияние на результаты экспериментов
Mycoplasma gallisepticum	Микоплазмоз	Цыплята, индейки, фазаны, перепела	Воздушно-капельный	Наличие возбудителя в яйце, высококонтагиозное заболевание
Mycoplasma synoviae M. meleagridis	Инфекционные синовииты	Цыплята, индейки, фазаны, голуби	Оральный	Высококонтагиозное заболевание
Mycoplasma gallinarium	Не определенные заболевания	Цыплята, индейки, фазаны, голуби	Воздушно-капельный	Возможно наличие возбудителя в яйце
Pasteurella multocida	Птичья холера	Цыплята, индейки	Оральный	Высококонтагиозное заболевание и смерть только в случае стресса
Salmonella gallinarium	Белая бациллярная диарея	Цыплята, почти все птицы, млекопитающие	Оральный	Возможно наличие возбудителя в яйце, высококонтагиозное заболевание и смерть, особенно у цыплят

1	2	3	4	5
Haemophilus paragallinarum	Контагиозный куриный ринит	Цыплята, индейки	Воздушно-капельный	Высококонтагиозное заболевание
Chlostridium perfringens	Некротический энтерит	Различные виды животных, человек	Оральный	Высококонтагиозное заболевание, в большинстве случаев латентное течение, смерть
Escherichia coli	Колибациллез	Различные виды животных, человек	Оральный	Высококонтагиозное заболевание, особенно в случае стресса, важно как вторичное проникновение
Listeria monocytogenes	Листериоз	Различные виды животных, человек	Оральный	Низкая распространенность заболевания
Mycobacterium avium	Птичий туберкулез	Цыплята, различные виды птиц и млекопитающих, человек	Оральный, при определенных обстоятельствах воздушно-капельный	Возможно наличие возбудителя в яйце, высококонтагиозное заболевание и смерть
Staphylococcus aureus	Стафилококкоз	Цыплята, индейки, другие виды птиц	Кожный, воздушно-капельный	Изменения кожи, артриты, иногда септицемия
Streptobacillus moniliformis	Птичий стрептобациллез	Индейки, крысы, мыши, морские свинки, кролики, человек	Через укусы крыс (содоку или хейверхиллская лихорадка)	Искажение результатов эксперимента

Таблица 13

ПЕРЕЧЕНЬ НАИБОЛЕЕ ОПАСНЫХ ИНВАЗИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПТИЦЫ, ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ И ИСКАЖАЮЩИХ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Возбудитель	Заболевания	Биориск заражения для человека и животных	Пути заражения	Контагиозность, симптоматика и исход. Влияние на результаты экспериментов
Eimeria spp.	Кокцидоз	Цыплята, индейки, голуби, гуси	Оральный	Высококонтагиозное заболевание, слабость, смерть
Histomonas meleagridis	Гистомониаз	Цыплята, индейки	Оральный	Энтерит, гепатит. Искажение результатов эксперимента
Ascaridia sp.	Аскаридоз	Цыплята и другие птицы	Оральный	Высококонтагиозное заболевание, слабость

1	2	3	4	5
Capillaria sp.	Капилляри-доз	Цыплята, индей-ки, фазаны и дру-гие виды птиц	Оральный, через яйцо или проме-жуточного хозяина	Высококонтагиозное заболевание, слабость
Heterakis gallinae	Гетеракиоз	Цыплята и другие виды птиц	Оральный	Высококонтагиозное заболевание, слабость
Syngamus trachea	Сингамоз	Цыплята и другие виды птиц	Оральный	Диспноэ, апатия. Иска-жение результатов экспе-римента
Davainea sp.	Солитерная инвазия	Цыплята, индей-ки, голуби	Оральный (проме-жуточный хозяин)	Высококонтагиозное заболевание, слабость
Hymenolepis sp.	Глистная инвазия	Цыплята, индей-ки, голуби	Оральный (проме-жуточный хозяин)	Высококонтагиозное заболевание, слабость
Raillietina sp.	Глистная инвазия	Цыплята, индей-ки, различные виды животных	Оральный	Зуд, анемия, раздражение кожи, высококонтагиоз-ное заболевание

Микробиологический мониторинг

Микробиологический статус животного также является определяющим для результатов эксперимента. Микробиологический контроль лабораторных животных посредством ПЦР-реакций, посева флоры на питательных средах, серологических и микроскопических исследований, преследует обычно 2 цели: диагностику заболеваний и контроль микробиологического статуса.

Основой диагностики заболевания является микробиологическое обследование, но в ходе ее также учитывается и другая информация, касающаяся клинической картины, репродуктивных функций и патологий. Образцы микробов и пробы, которые необходимо взять у животных, определяются соответственно клиническими и патологическими отклонениями. Время проведения контроля не фиксировано и зависит от проявления заболеваний.

Микробиологический мониторинг представляет собой процесс, призванный периодически подтверждать неизменность микробиологического статуса животного или группы животных по сравнению с ожидаемыми показателями.

В этих целях у случайно выбранных животных из общей популяции берутся пробы для выявления определенных видов микробов с целью

выяснения микробиологического статуса животных. Таким образом, эти исследования могут проводиться с целью обнаружения как патогенов, так и непатогенов, то есть микробов, являющихся частью нормальной флоры. В микробиологический контроль необходимо также включать обследование на наличие паразитов.

Количество животных, у которых необходимо взять пробы для микробиологического контроля, зависит от уровня инфицирования популяции. Например, в случае, если показатель инфицирования превышает 50%, для обнаружения возбудителя достаточно взять анализы у нескольких животных, но если уровень инфицирования ниже 20%, возбудителя можно найти, только обследовав, как минимум, 20 особей. В случае, если искомые патогены обладают средними и высокими показателями инфицирования 20–50%, способными повлиять на результаты исследования, достаточно обследовать 10 особей.

С другой стороны, контроль колоний животных рекомендуется проводить каждые 2–3 месяца, поскольку высокий уровень антител в организме животного сохраняется в течение нескольких месяцев после инфицирования. Таким образом, исследование присутствующих антител является важной процедурой диагностики в микробиологическом контроле.

Микробиологическое обследование и контроль, а также диагностика заболеваний представляют ряд трудностей ввиду ограниченного доступа к необходимому оснащению лабораторий и реагентам, включая качественные питательные среды и антигены для серологических тестов, а также по причине недостаточного количества квалифицированных специалистов. Создание диагностических лабораторий во всех местах содержания лабораторных животных представляется нецелесообразным. Вместо этого целесообразно использовать те центры, которые проводили бы микробиологические обследования, консультировали по вопросам осуществления контроля качества животных и осуществляли подготовку сотрудников для центров лабораторного животноводства. Обследование на присутствие паразитов может проводиться на месте, поскольку его осуществление проще и более экономично, чем тесты, основанные на посевах и серологических исследованиях, хотя возможно использование простых наборов для серологических тестов.

Для проведения микробиологического контроля могут применяться различные методики. В общем виде методы проверки могут быть сведены к некоторым обязательным моментам.

Использование животных-«индикаторов» с известным микробиологическим статусом. Животных помещают в ту же окружающую среду, в которой находится проверяемая популяция, и периодически их умерщвляют и обследуют. Голые (атимичные) мыши являются прекрасными

индикаторами, поскольку у них присутствует иммунодефицит и они особенно подвержены воздействию патогенов. Но данные мыши не подходят для обнаружения изменений в серологическом титре, который может указывать на наличие вирусов, поскольку антигенный ответ у голых мышей отсутствует. Для определения серологического титра необходимо использовать животных с соответствующим иммунным статусом.

Выборка животных из популяции колонии для проведения лабораторных исследований. Это – общее посмертное, микробиологическое и гистологическое обследование, выявление паразитов и т.д. Степень и детальность проводимой проверки зависит от величины расходов вида и качества оборудования. Частота проведения проверок и количество животных, используемых в ходе нее, зависят от многих факторов; шансы обнаружить инфекцию зависят от количества проверенных животных по отношению к общему количеству особей в колонии (в процентном выражении), а также от степени распространения инфекции среди животных.

Плановая проверка животных, которые умерли или были умерщвлены, включая особей, использовавшихся для экспериментов. Такая проверка позволит обнаружить инфекции или повреждения, угрожающие здоровью колонии и качеству проводимых экспериментов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это эффективный способ получения *in vitro* большого числа копий специфических участков молекулы ДНК. Их амплификация – иногда в миллионы раз – осуществляется в ходе трехэтапного циклического процесса. Для ПЦР необходимы: 1) два синтетических олигонуклеотидных праймера, комплементарные соответствующим участкам ДНК-мишени; 2) ДНК-мишень длиной от 100 до ~35 000 пар нуклеотидов; 3) термостабильный фермент ДНК-полимераза, который осуществляет синтез новой цепи ДНК; 4) четыре дезоксирибонуклеотида.

Типичная ПЦР-амплификация состоит в многократном повторении из следующих трех реакций. *Денатурация.* Образец ДНК выдерживают при температуре 95°С в течение по крайней мере 1мин. Помимо ДНК, в реакционной смеси содержатся в избытке два праймера, термостабильная ДНК-полимераза и четыре дезоксирибонуклеотида. *Отжиг.* Температуру смеси медленно понижают до ~55°С, при этом праймеры спариваются с комплементарными последовательностями ДНК-мишени. *Синтез.* Температуру повышают до ~72°С – величины, оптимальной для работы ДНК-полимеразы. Начинается синтез новой комплементарной цепи ДНК, инициируемый праймерами. Все реакции проводят в пробирках, погруженных в термостат (амплификатор). Смена температурного режима и его поддержание осуществляются автоматически. Каждый цикл длится 3–5 мин.

Таблица 14

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Метод	Преимущества	Недостатки
Микроскопическое исследование	Простота. Прямое выявление патогенных микроорганизмов. Возможность различения микроорганизмов по морфологическим признакам	Трудоемкость, длительность. Низкая чувствительность. Невозможность различения сходных микроорганизмов. Необходимость высокой квалификации персонала для интерпретации результатов
Культивирование in vitro для иммунизации мышей	Обнаружение только жизнеспособных микроорганизмов. Возможность определения вирулентности и инфекционности.	Длительность анализа, высокая стоимость. Разные линии животных дают разные ответы. Потеря жизнеспособности в организме животного. Использование животных
Иммунохимические методы	Простота, непродолжительность анализа. Возможность автоматизации. Возможность тестирования большого числа образцов.	Не всегда специфичен. Невозможность разграничения острой и латентной форм инфекции
Полимеразная цепная реакция – ПЦР	Простота, быстрота, высокие чувствительность и специфичность. Прямое обнаружение ДНК-возбудителя. Возможность различения разных видов патогенов. Независимость результатов от предыдущих инфекций. Не требует жизнеспособности патогенов. Возможность автоматизации	Невозможность различить живые и мертвые микроорганизмы. Возможность получения ложноположительных результатов

При диагностике различных заболеваний метод ПЦР все чаще используется наряду с такими традиционными методами, как бактериологический и иммунохимический, особенно в таких областях клинической диагностики, как: ранняя диагностика вирусных и бактериальных инфекций (в т.ч. хламидиоза, лептоспироза, листериоза, бруцеллеза, лейкоза); диагностика труднокультивируемых, некультивируемых и персистирующих форм патогенных микроорганизмов; диагностика хронических и латентных инфекций; идентификация возбудителей с высокой антигенной изменчивостью; идентификация внутриклеточных паразитов (в т.ч. возбудителя токсоплазмоза).

В последние годы ПЦР активно вытесняется современными протеомными, геномными и нанотехнологическими подходами и методами. Они, несомненно, дают меньше ложноположительных откликов, но ограничиваются высокой стоимостью оборудования и реактивов.

Бактериологические исследования

Бактериологические исследования проводятся культуральными методами с использованием дифференциальных и обогащенных питательных сред с последующей биохимической идентификацией бактерий и серологическим типированием.

Среди паразитарных болезней можно выделить болезни, вызываемые клещами, гельминтами, простейшими и грибами. Данные заболевания относятся к антропозоонозам. Методы обнаружения эктопаразитов включают макроскопический осмотр, прямой стереомикроскопический осмотр, микроскопия соскобов кожи, идентификация обнаруженных паразитов. Методы исследования на наличие эндопаразитов включают полное вскрытие животного, макроскопический осмотр вскрытых органов и их содержимого, микроскопию нативных препаратов, метод декантирования, флотации, метод приготовления постоянно окрашенных препаратов и их микроскопию, идентификацию паразитов. С появлением полимеразной цепной реакции (ПЦР) отпала необходимость в выделении возбудителя и очистке его ДНК – для анализа можно использовать очень небольшое количество неочищенного биологического материала хозяина. Преимущества и недостатки основных методов диагностики, используемых в современной клинической практике, приведены в Таблица 14.

Генетический мониторинг

Лабораторных животных используют для проведения исследований в области онкологии, токсикологии, вирусологии, иммунологии, трансплантологии, физиологии, сравнительной генетики и многих других областях биологии и экспериментальной медицины. Очевидно, что для решения таких разнохарактерных задач необходимо иметь животных с определенными биологическими особенностями – для каждой задачи своими. Выведение инбредных линий позволило получить таких животных. Основным достоинством инбредной линии является то, что все животные внутри этой линии гомозиготны и однородны по генотипу. Использование инбредных животных в эксперименте позволяет получать воспроизводимые результаты и повышает эффективность и надежность биологических исследований.

Генетическая однородность животных в пределах одной инбредной линии поддерживается путем применения специальной методики разведения таких линий. Но даже при тщательном соблюдении всех правил, при разведении инбредных животных существует опасность нарушения гомозиготности. Причиной этого могут быть спонтанные мутации или случайные скрещивания (генетическая контаминация). И если мутации приводят к образованию новых линий или сублинейной дивергенции, то случайное скрещивание ведет к необратимой потере гомозиготности, то есть к потере инбредного статуса и соответствующих фенотипических качеств каждого отдельно взятого животного. Опасность генетической контаминации особенно велика, когда в одном помещении содержатся несколько линий с одинаковой окраской шерсти.

Эффективным инструментом контроля генетической однородности животных инбредных линий являются ДНК-маркеры, основанные на методе полимеразной цепной реакции. Основными преимуществами таких маркеров является их высокая степень диспергированности по геному, независимость от возраста и физиологического состояния животного, а также простота, надежность и воспроизводимость лабораторных манипуляций, необходимых для выявления таких маркеров. При амплификации геномной ДНК мышей разных линий с определенными праймерами образуется уникальный для каждой линии электрофоретический спектр продуктов амплификации, характеризующий геномную конституцию. Эти данные можно использовать для мониторинга генетической стандартизации инбредных линий. Микробиологический статус лабораторных животных необходимо строго контролировать. В настоящее время растет количество инфекционных агентов, которые можно диагностировать с помощью ПЦР, в том числе вирусы, бактерии, простейшие микроорганизмы.

Последовательность генома мыши была опубликована в декабре 2002 г. Это имеет большое значение, так как геном мыши составляет такое же число генов, как и геном человека, причем 99% этих генов, по-видимому, идентичны, а 96% расположены в том же порядке. Это значит, что гены болезней, идентифицированные у мыши, могут быть перенесены на генную карту человека. Можно провести экспериментальные скрещивания между мышами с различными признаками, а затем очень быстро начать изучение полученного потомства. Можно получить мутантных мышей с определенными генными дефектами, фенотип которых можно потом изучать.

За последние годы было получено большое количество мышей – мутантов, у которых мутации, вызывающие потерю или приобретение какой-либо функции, находились в специфических генах, представляющих интерес с точки зрения медицины. Эти так называемые «нокаут» – или «нокин»-мутанты были сконструированы методами генной инженерии. В результате мутации инактивируется один-единственный ген. Так были созданы многие полезные модели моногенных болезней, включая синдром Леш–Нихана, кистозный фиброз, β-талассемию и синдром слабой Х-хромосомы.

В других случаях с использованием антисмысловой РНК и аналогичных подходов был достигнут эффект утраты функции генов. Модель диабета была получена путем специфичной экспрессии рибозима, направленного против мРНК глюкокиназы в β-клетках поджелудочной железы мыши.

Болезнями, вызываемыми доминантными мутациями, приводящими к приобретению функции, могут быть моделированы просто переносом гена с эквивалентной мутацией в геном мыши с помощью обычных технологий переноса генов. Например, мышиные модели болезни Альцгеймера были получены суперэкспрессией гена белка – предшественника амилоида, а модель синдрома Вернера (преждевременного старения) – путем экспрессии доминантно-негативного мутанта гена WRN. Одним из первых примеров моделирования болезни, связанной с приобретением функции, – экспрессия в мышах мутантной формы прионного белка, моделирующая нейрогенеративный синдром Герштмана – Штресслера – Шейнкера (GSS).

Стандартизация линий лабораторных мышей

Широкое распространение инбредных линий мышей по лабораториям мира, а также создание новых линий потребовали разработки единых правил для их обозначения. В связи с этим был создан Международный комитет по стандартизации генетической номенклатуры мышей, куда вошли ученые разных стран. В 1952 г. Комитет впервые опубликовал правила стандартного обозначения линий мышей. Начиная с 1960 г. эти правила и списки инбредных линий мышей через каждые 4 года публикуются в журнале «Cancer research».

В соответствии с рекомендацией Комитета по стандартизации инбредная линия может быть зарегистрирована как стандартная, если животных этой линии размножали братско-сестринским инбридингом не менее 20 поколений; допускается скрещивание матерей с сыновьями или отцов с дочерьми.

Обозначения инбредных линий рекомендуется писать заглавными латинскими буквами, без снижений или повышений. При выборе символа для новой линии желательны более короткие обозначения, которые необходимо сверять с опубликованными списками линий во избежание повторений.

В названии давно существующих линий мышей нет общих правил. Часто оно появлялось в ходе работы по выведению линии, складывалось из символов мутантных генов окраски (DBA–dba), обозначения масти животного и индивидуального номера (C57BL). Название некоторых новых линий представляет собой символы мутантных генов (HRS, GLF), сокращенное обозначение места выведения линии и масти (NZB- и NZW-новозеландские черные и белые) или назначения линии (YT – юрловская тестерная). В большинстве же случаев перевод обозначений линий на русский язык не имеет смысла.

Линии, происходящие от общих предков, но разделенные при передаче животных в другую лабораторию на 8–19 поколении братско-сестринского инбридинга (т.е. пока мыши еще сохраняют некоторую гетерозиготность) и поддерживаемые раздельно в течение последующих поколений, принято считать сублиниями. Сублинии, кроме того, образуются при передаче племенного материала готовой инбредной линии в другие лаборатории. В этом случае в результате мутаций при длительном раздельном размножении групп животных одной линии накапливаются генетические различия между ветвями исходной линии, приводящие к биологическим отличиям. Так, существующие в мировой коллекции четыре сублинии линии C3H отличаются друг от друга по онкологической характеристике, пять сублиний мышей C57BL отличаются друг от друга и от исходной целым рядом биологических особенностей и гистологически несовместимы. Поэтому не менее важно соблюдение правил написания сублиний. Сублинию обозначают также латинскими буквами через косую черту после написания основной линии. Символы сублиний чаще образуются из сокращения фамилии исследователя или названия лаборатории, где сублиния поддерживается. Первая буква этого обозначения – прописная, последующие – строчные. Так, символ CBA/Ca обозначает сублинию Картера (Carter) линии CBA. Линии: CC57BR/Mv, CC57W/Mv – выведены Н.Н.Медведевым (Mv). Если новая сублиния образовалась путем передачи какой-либо сублинии из одной лаборатории в другую, то старый символ сохраняется и к нему добавляется новый. Например, CBA/CaLac обозначает сублинию Картера, поддерживаемую в английском Центре лабораторных животных (Lac). Число или строчная буква также могут быть использованы как символы сублиний. Их положение относительно других символов отражает историческую последовательность разделения сублиний. Строчные буквы, следующие непосредственно за косой чертой, означают, что сублинии разделены до достижения полной гомозиготности. Например, обозначение сублиний C57BR/a и C57BR/cd показывает, что они разделены после девяти поколений инбридинга. Обычно число или строчные буквы не используются для обозначения сублиний, разделенных после 20 поколений инбридинга. Исключение составляют давно применяемые символы, введенные до выработки правил, например DBA/1 и DBA/2.

Совершенно необходимо в публикациях употреблять хотя бы один раз полное название линии со всеми сублинейными символами. Многие сублинии имеют хорошо установленные различия. Например, мыши

сублинии CBA/J несут ген дегенерации ретины, в то время как линии CBA/Ca такого гена не имеют. Эти же сублинии различаются по радиочувствительности, гистологически несовместимы между собой и отличаются по крайней мере по пяти полиморфным локусам. Обозначение инбредной линии, несущей мутантный ген, состоит из символа исходной линии, символа сублиний, следующего за ним дефиса и символа гена, набираемого курсивом. Например, BALB/cY-*wal* означает, что сублиния имеет рецессивную мутацию (waved alopecia). Иногда мутантный ген поддерживается в гетерозиготном состоянии, это показывают включением знака (+): C57BL/6Y-+/W^y; 129/Re-+/*dy*. Иногда в обозначении линии есть ряд символов, отражающих различные манипуляции, которым животные данной линии подвергались. Так, одним из эффективных способов избавления линий от носительств болезнетворных микроорганизмов является вскармливание мышат, полученних кесаревым сечением, под самками, свободными от патогенной микрофлоры, в гнотобиотическом изоляторе. Того же эффекта можно добиться пересадкой оплодотворенных яйцеклеток. В некоторых случаях применяется пересадка яичников. Сублинии, выделенные при помощи вскармливания кормилицами, обозначаются добавлением буквы «f» (от английского «fostered»). Линия, в которой была произведена пересадка яйцеклеток или яичников, аналогично обозначается добавлением букв «е» (от английского «egg») или «о» (от ova). Например, символ AeB означает, что яйцеклетки мышей линии А были пересажены самкам мышей линии C57BL.

Иногда используются составные сложные обозначения линий, подвергшихся каким-либо манипуляциям или введению гена. Порядок элементов в таком обозначении соответствует истории линии. DBA/2eB – в этом положении символ линии «2» означает, что были пересажены самкам C57BL яйцеклетки именно DBA/2. Если же символ сублинии стоит вслед за символом ее получения или введенного гена, то он означает исследователя или лабораторию, где была произведена соответствующая манипуляция. DBA/2eB/De означает, что Деринджер получил эту сублинию путем пересадки яйцеклеток мышей линии DBA/2 самкам C57BL.

Инбредный возраст линии определяется количеством поколений братско-сестринского инбридинга, обозначают его буквой «F» и пишут в круглых скобках – A(F87). Если нет точных данных о количестве поколений инбридинга и известна только часть истории линии (например, только число поколений инбридинга в лаборатории, в которой эта линия поддерживается последнее время), то неизвестную часть истории линии означают знаком вопроса – 101/H (F?+22).

В последние годы разработана методика сохранения линий животных путем замораживания бластоцист мышей и хранения их при низкой температуре в жидком азоте. Эти бластоцисты могут затем в любое время быть имплантированы самкам после расконсервирования для восстановления линии. Эта методика начинает осваиваться центрами, поддерживающими большие коллекции линий. Учитывая перспективность данного метода сохранения коллекции линий и возможное широкое распространение в будущем, Комитет по стандартизации генетической номенклатуры уже опубликовал правила обозначения линии, подвергнувшейся этой операции. В соответствии с этими правилами сохранение линии в замороженном состоянии будет обозначаться добавлением буквы «Р» (от английского «preservation»). Если после расконсервирования эмбрион имплантирован самке матери той же линии, что и эмбрион, то других дополнений в обозначении не требуется. Если же мать другой линии, то эта линия может быть указана так же, как и в случае пересадки яйцеклеток. Таким образом, символы C57BL/6peCBA/H обозначают, что эмбрионов мышей линии C57BL/6 хранили в законсервированном состоянии и затем вырастили в самках линии CBA/H. Лаборатория или исследователь, хранившие линию в виде законсервированных бластоцист, могут быть указаны обычным добавлением сублинейного символа C57BL/6peCBA/HBy, означающего, что манипуляции с линией произведены Бейли (Bailey).

При обозначении инбредного возраста линий в круглых скобках вместе с буквой «Р» указываются годы заморозки и расконсервирования. Например, F37+(P1975-1977)+F16 означает, что линия была законсервирована на 37-м поколении в 1975 г., хранилась до 1977 г., затем была расконсервирована и прошла еще 16 поколений инбридинга.

Можно видеть, что полные обозначения линий несут много информации. Знание правил обозначения дает научному работнику, читающему статью, дополнительную информацию без нежелательного в современных статьях многословного описания и характеристик используемых объектов. Вместе с тем иногда возникает необходимость сокращения длинных обозначений. Особенно это нужно, когда речь идет о конгенных линиях, полученных скрещиванием, или о гибридах. Для стандартных широко распространенных линий мышей рекомендуются следующие сокращения (Таблица 15).

Таблица 15

ОБОЗНАЧЕНИЯ НЕКОТОРЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ЛИНИЙ МЫШЕЙ

Полное название линии	Сокращение	Полное название линии	Сокращение
AKR	AK	C57BR	BR
BALB/c	C	C57L	L
C3H	C3	DBA/1	D1
C57BL	B	DBA/2	D2
C57BL/6	B6	HRS/J	HR
C57BL/10	B10	RIII	R3

В соответствии с этим правилом гибриды F_1AKR/J × DBA/2J будут записаны как AKD2F1. Следует обратить внимание на то, что во всех записях скрещиваний или обозначениях гибридов символ линии самки пишут на первом месте. Международным Комитетом по стандартизации номенклатуры инбредных линий [Festing, 1980, Staats, 1980] зарегистрированы следующие сублинейные символы линий, полученных в учреждениях СССР:

Icgn – Институт цитологии и генетики Новосибирского отделения АН СССР (ныне – Институт цитологии и генетики СО РАН),
Iem – Институт экспериментальной медицины АМН СССР (ныне НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург),
Igg – Институт общей генетики АН СССР (ныне Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Москва),
Kv – отделение «Крюково» Центрального питомника АМН СССР (ныне филиал «Андреевка» НЦБМТ РАМН, Московская область),
Mv – Медведев Н.Н. Этим символом обозначаются линии, выведенные им или полученные от него на размножение,
Rap – питомник «Рапполово» АМН СССР (ныне питомник «Рапполово» РАМН, Ленинградская область),
Sto – питомник «Столбовая» АМН СССР (ныне филиал «Столбовая» НЦБМТ РАМН, Московская область),
Y – Научно-исследовательская лаборатория экспериментально-биологических моделей АМН СССР (ныне Научный центр биомедицинских технологий РАМН – НЦБМТ РАМН, Московская область).

Процедуры мониторинга здоровья мини-свиней

Процедуры мониторинга включают желудочно-кишечный тракт, тимус, щитовидную и паращитовидную железы. Светлогорские минисвиньи свободны от любых паразитов, бактериальных инфекций и вирусных болезней. Гистопатология находит спонтанные возбудители в нескольких случаях, но обычно локально и умеренно. Наиболее свежие и наиболее широкие коллекции контрольных данных опубликованы в литературе. В частности, найдены 4 главных спонтанных проявления: 1) артериит (рассеянный, местный, некротичный/фибриноидный), 2) тубулярная атрофия/гипоплазия в яичках (местно), 3) серозная атрофия (клетки костного мозга, главным образом в бедренной кости/большеберцовой кости) и 4) геморрагический синдром. Этиология всех четырех проявлений неизвестна. Тромбоцитопения распространена при геморрагическом синдроме и, вероятно, связана с иммунокомплексом, сформированным условиями и отмеченным дегенеративными/регенеративными мегакариоцитичными изменениями.

Глава 6

Технология содержания лабораторных животных

Получение надежных и воспроизводимых результатов эксперимента с использованием лабораторных животных возможно только при соблюдении всех правил их содержания.

Основные правила содержания лабораторных животных

Лабораторным животным в питомнике и ЭБК должны быть обеспечены:

- полноценное кормление и уход;
- поддержание нормального состояния здоровья;
- содержание в соответствующих для каждого вида нормативных условиях;
- возможность удовлетворения физиологических и поведенческих потребностей;
- ежедневный контроль условий содержания;
- быстрое устранение недостатков и факторов, могущих повлечь за собой стресс и страдания животных.

В каждом помещении питомника и ЭБК рекомендуется содержать животных только одного вида и участвующих в одном исследовании, за исключением отдельных случаев, предусмотренных условиями эксперимента, на каждой клетке (боксе, вольере) должна быть этикетка с указанием данных о животном и другой специальной информацией.

Обслуживание одним работником животных разного вида в питомнике не допускается. В случае обслуживания одним рабочим небольших групп животных разных видов в ЭБК следует соблюдать следующую по-

следовательность при работе: морские свинки, мыши, крысы, кролики. Такая последовательность обслуживания обусловлена чувствительностью лабораторных животных к появлению возможной инфекции.

Предпочтительно постоянное закрепление персонала за определенными помещениями и для выполнения определенных технологических процедур. За каждой секцией или однородной группой помещения назначается ответственное лицо, несущее административную ответственность за соблюдение правил содержания и режима работы.

Норма обслуживания зависит от системы содержания, вида животных, уровня механизации производства. Численность персонала может быть определена на основе норм, приведенных в Таблицах 16 и 17.

Таблица 16

НОРМА ОБСЛУЖИВАНИЯ КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА ОДНОГО РАБОТНИКА

Вид животных	Количество голов	Количество клеток
Мыши	до 2000	200
Крысы	1000	100
Хомяки	1000	100
Морские свинки	500	100
Кролики	120	120
Собаки	25–30	25–30
Кошки	60–70	–
Мини-свиньи	25–30	–
Птицы	80–120	–

Таблица 17

НОРМА ОБСЛУЖИВАНИЯ УЛУЧШЕННЫХ КОНВЕНЦИОНАЛЬНЫХ И СПФ ЖИВОТНЫХ НА 1 РАБОТНИКА

Вид животных	Вес тела	Тип содержания	Количество голов
Мыши	16–23 г	Клетки	1250
Крысы	180–220 г	Клетки	600
Хомяки	80 г	Клетки	600
Морские свинки	270–350 г	Клетки	415
Кролики	2-3 кг	Клетки	100
Собаки	<20 кг >20 кг	Боксы Боксы	24–18
Кошки	2-3 кг	Клетки Колония	50–60
Мини-свиньи	20–30 кг	Клетки Боксы	21–22
Птицы	1,5 кг	Индивид. содержание	80

Требования к содержанию животных

В соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях

(Совет Европы, Страсбург, 2004 г.), следует придерживаться нормативов содержания лабораторных животных.

Рекомендуемые температурные режимы содержания животных в разных условиях представлены в Таблице 18. В особых случаях для молодых или голых особей может требоваться содержание при более высоких температурах.

Все ввозимые в страну животные должны пройти карантин согласно национальному законодательству (Таблица 19). Сроки карантина в условиях лаборатории обычно определяются соответствующим лицом исходя из обстоятельств, этим лицом обычно является назначенный учреждением ветеринар.

Таблица 18

РЕКОМЕНДУЕМЫЕ ТЕМПЕРАТУРНЫЕ РЕЖИМЫ СОДЕРЖАНИЯ ЖИВОТНЫХ В КЛЕТКАХ, ВОЛЬЕРАХ И ВНУТРЕННИХ ЗАГОНАХ

Вид животных или группы видов	Оптимальная температура °С
Мышь	20–26
Крыса	20–26
Сирийский хомяк	20–26
Мышки-полевки	20–26
Морская свинка	20–26
Перепелиные	20–24
Кролик	15–21
Кошка	18–29
Собака	15–21
Хорек	15–21
Птицы (курицы)	16–27
Овцы и бараны	10–24
Мини-свиньи	10–24
Лошади, жеребята	10–24

Таблица 19

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ КАРАНТИННОГО ПЕРИОДА В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРИИ

Вид	Продолжительность карантина, дней
Мышь	5–15
Крыса	5–15
Мышки-полевки	5–15
Морская свинка	5–15
Сирийский хомяк	5–15
Кролик	20–30
Кошка	20–30
Собака	20–30

Высота клетки представляет собой вертикальное расстояние между полом клетки и ее верхней горизонтальной частью.

На всех стадиях процедур необходимо обеспечить животному жизненное пространство согласно этой таблице и учесть потенциально возможный рост животного (Таблицы 20–23).

Содержание кошек в клетках (Таблица 23) должно быть строго ограничено. Их необходимо выпускать размяться хотя бы раз в день, когда это не мешает процедурам. Вольеры для кошек должны быть оборудованы поддоном для туалета, широкими полками для отдыха и предметами, подходящими для лазания и стачивания когтей.

При подсчете минимальной площади клетки можно учитывать площадь полок. Минимальная площадь клетки для кошки и подстилки включает в себя площадь гнезда для котят.

Собак не следует содержать в клетках дольше, чем того требуют процедуры. Собаки, содержащиеся в клетках, должны выпускаться из них хотя бы раз в день для разминки, кроме случаев, когда это не совместимо с условиями процедур. Должен быть установлен лимит, сверх которого

Таблица 20

РАЗМЕРЫ КЛЕТОК ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ И ПРОЦЕДУР ДЛЯ МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ И КРОЛИКОВ

Вид	Минимальная площадь клетки, см^2	Минимальная высота клетки, см
Мышь	180	12
Крыса	350	14
Сирийский хомяк	180	12
Морская свинка	600	18
Кролик 1 кг	1400	30
2 кг	2000	30
3 кг	2500	35
4 кг	3000	40
5 кг	3600	40

Таблица 21

РАЗМЕРЫ КЛЕТОК ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ МЕЛКИХ ГРЫЗУНОВ

Вид	Минимальная площадь клетки для матери и потомства, см^2	Минимальная высота клетки, см
Мышь	200	12
Крыса	800	14
Сирийский хомяк	650	12
Морская свинка	1200	18
Несколько самок морских свинок с детенышами	1000 на одну взрослую особь	18

животное нельзя держать в клетке без разминки. Пространство для разминки должно быть достаточно большим, чтобы обеспечивать собаке свободу движений. Клетки с сетчатым полом не следует использовать для содержания собак, кроме случаев, когда этого требует эксперимент.

Ввиду большого различия собак по высоте в холке и отсутствия стабильной зависимости между высотой и весом, минимальную высоту клетки нужно определять исходя из высоты собаки в холке (Таблицы 24, 25). Обычно минимальная высота клетки представляет высоту собаки в холке, помноженную на 2.

Все вольеры должны быть оборудованы эффективной дренажной системой.

Мини-свиней не следует содержать в клетках; в случае, если того требует эксперимент, время содержания в клетке должно быть сведено к минимуму.

Требования к содержанию мини-свиней и овец даны в Таблицах 26–28. Стойло должно быть достаточно широким, чтобы позволить животному удобно лежать.

Сечение сетки клетки не должно превышать 10×10 мм для цыплят и 25×25 мм для молодых и взрослых особей. Толщина проволоки клетки должна быть не менее 2 мм. Угол наклона не должен превышать 14% (8°). Длина поилок должна соответствовать длине кормушек. Если имеются чашки, каждая птица должна иметь доступ к двум. Клетки должны быть

Таблица 22

РАЗМЕРЫ КЛЕТОК ДЛЯ РАЗВЕДЕНИЯ КРОЛИКОВ

Вес самки, кг	Минимальная площадь для самки и подстилки, м^2	Минимальная высота клетки, см	Минимальная площадь гнезда, м^2
1	0,30	30	0,10
2	0,35	30	0,10
3	0,40	35	0,12
4	0,45	40	0,12
5	0,50	40	0,14

***Примечание**: Минимальная площадь для самки и подстилки включает площадь гнезда.*

Таблица 23

РАЗМЕРЫ КЛЕТОК ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ КОШЕК (ДЛЯ ПРОЦЕДУР И РАЗВЕДЕНИЯ)

Вес кошки, кг	Минимальная площадь клетки на 1 кошку, м^2	Минимальная высота клетки, см	Минимальная площадь для кошки и подстилки, м^2	Минимальная площадь вольера для кошки и помета, м^2
0,5–1	0,2	50	–	–
1–3	0,3	50	0,58	2
3–4	0,4	50	0,58	2
4–5	0,6	50	0,58	2

Таблица 24

РАЗМЕРЫ КЛЕТОК ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ СОБАК

Высота собаки в холке, см	Минимальная площадь клетки, м²	Минимальная высота клетки, см
30	0,75	60
40	1,00	80
50	1,75	140

Таблица 25

ТРЕБОВАНИЯ К ВОЛЬЕРАМ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ И РАЗВЕДЕНИЯ СОБАК

Вес собаки, кг	Минимальная площадь вольера на 1 собаку, м²	Минимальная площадь прилегающей зоны для разминки на собаку, м²	
		1–3 собаки	больше 3-х собак
< 6	0,5	0,5 (1,0)*	0,5 (1,0)
6–10	0,7	1,4 (2,1)	1,2 (1,9)
10–20	1,2	1,6 (2,8)	1,4 (2,6)
20–30	1,7	1,9 (3,6)	1,6 (3,3)
> 30	2,0	2,0 (4,0)	1,8 (3,8)

** **Примечание**. Цифры в скобках означают общую площадь вольера на одну собаку. Собаки, содержащиеся вне помещений, должны иметь доступ к укрытию от плохих погодных условий. Если собаки содержатся в вольере с решетчатым полом, для ночного отдыха в вольере нужно организовать зону со сплошным полом. Решетчатые полы не должны использоваться, если того не требует эксперимент. Между вольерами необходимо сохранять расстояние, не позволяющее собакам нанести друг другу повреждения.*

Таблица 26

ТРЕБОВАНИЯ К КЛЕТКАМ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ МИНИ-СВИНЕЙ

Вес мини-свиньи, кг	Минимальная площадь клетки, м²	Минимальная высота клетки, см
5–15	0,35	50
15–25	0,55	60
25–40	0,80	80

Таблица 27

СОДЕРЖАНИЕ МИНИ-СВИНЕЙ И ОВЕЦ В ЗАГОНАХ

Вид животных и их вес, кг	Минимальная площадь загона, м²	Минимальная длина загона, м	Минимальная высота ограждения загона, м	Минимальная площадь загона для группы животных, м²/1 животное	Минимальная длина кормушки на голову, м
Мини-свиньи 10–30	2	1,6	0,8	0,2	0,20
30–50	2	1,8	1,0	0,3	0,25
50–100	3	2,1	1,2	0,8	0,30
Овцы < 70	1,4	1,8	1,2	0,7	0,35
Бараны < 70	1,6	1,8	2,0	0,8	0,35

Таблица 28

СОДЕРЖАНИЕ МИНИ-СВИНЕЙ И ОВЕЦ В СТОЙЛАХ

Вид животных и их вес	Минимальная площадь стойла, м²	Минимальная длина стойла, м	Минимальная высота ограждения стойла, м
Мини-свиньи <100 кг	1,2	2,0	0,9
Овцы <70 кг	0,7	1,0	0,9
Бараны <70 кг	0,8	1,0	0,9

Таблица 29

ТРЕБОВАНИЯ К КЛЕТКАМ ДЛЯ СОДЕРЖАНИЯ ПТИЦ (ПРОСТРАНСТВО ОЗНАЧАЕТ ОБЪЕМ, ПОЛУЧЕННЫЙ ПУТЕМ УМНОЖЕНИЯ ВНУТРЕННИХ ДЛИНЫ И ШИРИНЫ КЛЕТКИ)

Вид животных и их вес, г	Минимальное пространство, см²/1 птицу			Минимальная высота клетки, см	Минимальная длина кормушки на птицу, см
	на 1 птицу	для 2-х птиц	для 3-х и более птиц		
Куры 100–300	250	200	150	25	3
300–600	500	400	300	35	7
600–1200	1000	600	450	45	10
1200–1800	1200	700	550	45	12
1800–2400	1400	850	650	45	12
Взрослые петухи > 2400	1800	1200	1000	60	15
Перепелиные 120–140	350	250	200	15	4

оборудованы насестами, и птицы в одиночных клетках должны иметь возможность видеть друг друга (Таблица 29).

Требования к корму для SPF-животных

Кормление должно осуществляться полнорационным гранулированным кормом, обеспечивающим физиологические потребности организма животного в питательных и минеральных веществах, витаминах, микроэлементах и энергии и исключающим необходимость введения в корм дополнительных ингредиентов. Диеты рассчитываются с учетом видовых и физиологических (разведение, рост, взрослое состояние) особенностей животных. Разрабатываются также диеты, учитывающие генетические особенности метаболизма отдельных линий животных. Кормление животных при их воспроизводстве и использовании в экспериментах должно производиться одинаковым кормом.

Перед скармливанием корм в обязательном порядке повергается стерилизации в автоклаве с использованием вакуума при температуре 121–124°С, давлении 1,2 атм. в течение 20 мин. Корм можно также стерилизовать гамма-лучами. Гранулированный корм расфасовывается в двойные полиэтиленовые пакеты по 1,5–2,0 кг, которые герметично запаиваются, и корм в таком виде подвергается облучению в дозе 2,5 Мрад на кобальтовом облучателе. Этот вид стерилизации считается более щадящим и более надежным, но менее экономичным.

Размещение лабораторных животных, находящихся в эксперименте

Животные размещаются в групповых либо в индивидуальных (при возникновении агрессии друг к другу или при экспериментальной необходимости) клетках, предназначенных для содержания грызунов с возможностью контроля кормления и поения.

Размеры клеток и загонов определяются в соответствии с нормативами.

Параметры окружающей среды

В течение всего года, независимо от наружных климатических условий, в помещениях для лабораторных животных должны поддерживаться на требуемом уровне основные показатели микроклимата – температура и влажность воздуха, кратность воздухообмена, давление и скорость движения воздуха, содержание в нем загрязняющих веществ, уровень шума, освещенность, которые должны постоянно контролироваться и при необходимости – корректироваться, показатели приборов регистрируются в специальном журнале. В виварии должен быть предусмотрен резервный источник электропитания.

Измерение параметров температуры, влажности, освещенности и шума должно осуществляться автоматической системой мониторинга. Датчики располагают в каждой комнате содержания животных. Разводка системы – проводная.

Для вентилирования комнат лаборатории используют систему принудительной вентиляции. Система обеспечивает 100% приток свежего воздуха, оснащена тремя ступенями фильтрации: фильтрами грубой, тонкой и ультратонкой очистки. Она обеспечивает в комнатах содержания лабораторных животных необходимые параметры среды независимо от параметров наружного воздуха. В зданиях барьерного типа и в ЭБК с экспериментально-инфицированными животными предусматривается система фильтров грубой и тонкой очистки воздуха как на приточной, так и на вытяжной системах вентиляции. С помощью фильтров грубой

очистки из воздуха удаляются 60–95% частиц размером более 5 мкм. Фильтры тонкой очистки задерживают до 99,97% всех аэрогенных частиц размером менее 5 мкм, в питомниках и ЭБК при конвенциональном содержании лабораторных животных воздух должен очищаться как минимум фильтрами грубой очистки. При необходимости в помещениях может поддерживаться избыточное давление воздуха. Внутреннее давление в помещениях барьерного типа должно превышать наружное давление на 10-15 мм водяного столба. При работе с инфекционным материалом в помещениях с животными создается пониженное по отношению к смежным помещениям и коридорам давление воздуха до 5–10 мм водяного столба. В «грязном» коридоре предусмотрена только вытяжная вентиляция.

Комнаты содержания животных имеют 12-часовой цикл освещения с автоматическим включением света в 8:00 и выключением в 20:00. Освещенность – 325 лк на расстоянии 1 м от пола. Во время работы персонала интенсивность освещения можно увеличивать до 300–400 лк. Основное освещение выполняется посредством люминесцентных ламп. Окон в комнатах содержания животных нет (небольшие смотровые окна есть только в дверях). Помимо основного освещения в комнатах содержания животных предусмотрено аварийное освещение посредством осветительных приборов с лампами накаливания. Лампы основного и аварийного освещения расположены за пределами комнат – в зоне технологических помещений. Световой поток распределяется непосредственно в комнаты содержания животных через потолочные светофильтры из матового стекла, что позволяет беспрепятственно проводить аэрозольную дезинфекцию и внутреннюю уборку комнат.

В комнатах содержания животных шумовой фон создается самими животными, вентиляцией, персоналом при выполнении процедур и работе с животными. В присутствии персонала уровень шума в комнате с животными не должен превышать 85 Дб.

Для уменьшения излишнего шума в местах содержания животных система кондиционирования должна быть оборудована многоуровневыми шумоглушителями. Экспериментальные работы, сопровождающиеся шумовыми эффектами, ведутся вдали от комнат содержания животных. Обучение персонала направлено на уменьшение уровня шумового фона при выполнении процедур по уходу за животными.

Температура и влажность воздуха, кратность воздухообмена, давление и скорость движения воздуха должны ежедневно регистрироваться в специальных журналах.

Корма

Кормление лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков и др.) всех категорий должно осуществляться полнорационным гранулированным комбикормом, изготовленным в соответствии со стандартом «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных».

Гранулированный комбикорм следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, не зараженных амбарными вредителями и дикими грызунами складских помещениях, не имеющих посторонних запахов. Оптимальные условия хранения при температуре +5°С и влажности 50—60%. Показатели температуры и влажности в комнате регистрируются по показаниям термометра-гигрометра. Санитарная обработка комнаты проходит в соответствии с «Планом санитарных мероприятий в комнате хранения корма и подстила».

В зону содержания животных корм поступает только после автоклавирования. Двух—трехдневный запас проавтоклавированного корма может храниться в клетках в закрывающемся металлическом шкафу в «чистой» комнате. Непосредственно в комнатах содержания животных корм не хранится.

Помещения для приготовления кормов. Перед поступлением в зону содержания SPF-животных в комнате подготовки корма мешки с кормом вскрываются, корм засыпается в металлические поддоны и автоклавируется.

Раздача корма. Корм заносится в комнату содержания животных в клетках или на поддонах в количестве, необходимом для кормления. Для грызунов корм раздается (досыпается) в кормушки клеток из раздаточной емкости в соответствии с суточными нормами кормления или в соответствии с установленной исследовательским протоколом нормой. Во время еженедельной смены клеток с аксессуарами остатки корма вывозятся и утилизируются. Из клетки в клетку корм не переносится. Корм, упавший на пол, в кормушки не возвращается, выносится из комнаты и утилизируется.

Контроль качества корма. Периодически (один раз в 4 месяца) берутся пробы корма, находящегося в «чистой автоклавной» после автоклавирования на стерильность. Анализ осуществляется в лабораториях Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ. Заключение о проведении данного анализа должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Контроль за наличием паразитов осуществляется специализированным государственным предприятием системы санитарно-эпидемиологической службы по договору на проведение дезинфекционных работ. Заключение о проведении данного контроля должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Вода

В лабораторный корпус вода поступает из системы городского водопровода. Она фильтруется и собирается в резервуар системы. Система имеет две точки отбора воды в «чистой» автоклавной и точку отбора в моечно-стерилизационном блоке в конвенциональной зоне. В зоне содержания животных в «чистой» автоклавной вода наливается в стерильные питьевые бутылочки, которые закрываются стальными крышками с трубками-носиками, и на тележках развозится по комнатам содержания животных. Бутылочки меняются вместе с остатками воды не реже одного раза в 4 дня.

Контроль качества воды. С частотой, требуемой правилами эксплуатации системы фильтрации, проводится санация системы: промывка фильтра, замена либо обработка соответствующих картриджей, санитарная обработка. Проводится также профилактический осмотр инженером фирмы-производителя системы очистки воды. Проводимые процедуры документируются ответственным за поддержку системы инженером. Периодически (один раз в 4 месяца) проводится отбор проб воды из точек ее забора на чистоту. Этот анализ осуществляется в лабораториях Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ. Заключение о проведении данного контроля должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Подстилка

В лабораторном корпусе крысы и мыши содержатся в клетках прямого контакта с подстилкой. В качестве подстилки рекомендуется использовать опилки, стружки или мелкую щепу (длина 5—20 мм, толщина 1—2 мм) из экологически чистой древесины лиственных пород. Не допускается использовать подстилки из химически обработанной древесины, а также из древесины хвойных пород. Подстилка автоклавируется на поддонах при режиме 118°С в течение 30 мин.

Хранение подстилки и контроль паразитов. Бумага для подстилки хранится и режется в специальном вспомогательном помещении. Необходимое количество подстила поступает в корпус в резаном виде в закрытых полиэтиленовых мешках. Мешки в закрытом виде складируются в комнате хранения корма и подстила. Санитарная обработка комнаты проходит в соответствии с «Планом санитарных мероприятий в комнате хранения корма и подстила». Контроль наличия паразитов в подстилке осуществляется специализированным государственным предприятием системы санитарно-эпидемиологической службы по договору на проведение дезинфекционных работ.

Контроль качества. Периодически (один раз в 4 месяца) берутся пробы подстилки после автоклавирования для анализа стерильности. Этот анализ осуществляется в лабораториях Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ. Заключение о проведении данного контроля должно храниться в архиве ЭБК не менее 5 лет.

Разное оборудование для содержания/ухода и использования животных в эксперименте

Дополнительное оборудование и аксессуары должны соответствовать государственным стандартам или требованиям GLP.

Санитария

Частота смены подстилки. **Содержание в клетках с неконтактной подстилкой не используется. Контактная подстилка в клетках содержания крыс и мышей меняется с периодичностью один раз в 7 дней. Загрязненная подстилка меняется вместе с клеткой. Чистая подстилка рассыпается в клетки из расчета 0,5 л на 500 см ^{2}.**

Аксессуары клетки (решетка, разделитель для корма, карточкодержатели) и стеллажи также меняются еженедельно.

Исключением является смена подстила у беременных самок в предродовом периоде (за 1–2 дня до родов) и в послеродовом периоде (первая неделя лактации). Такой регламент смены подстила позволит уменьшить стресс у животных, не нарушая санитарные нормы.

Очистка и дезинфекция клеток с твердым полом проводится еженедельно. В отсеке моечного блока освобожденные от грязного подстила клетки моются щеткой с погружением в металлическую ванну с синтетическими моющими средствами. После этого клетки тщательно промываются в чистой раковине под струей проточной воды до исчезновения мыльной пены. Вымытые клетки составляются стопкой вверх дном на сетчатые стеллажи для сушки и затем передаются в монтажный зал. Решетки клеток и аксессуары моются механически в моечных машинах с использованием моюще-дезинфицирующих средств.

Ввиду разнообразия моющих и дезинфицирующих веществ данные средства подбираются индивидуально. Производимые в России и импортируемые дезсредства можно посмотреть на сайте www.infodez.ru.

Очистка и дезинфекция помещений для животных

В комплексе санитарно-гигиенических мероприятий, проводимых в питомниках и ЭБК, большая роль принадлежит дезинфекции, целью которой является уничтожение в окружающей среде возбудителей инфекционных заболеваний. Под стерилизацией понимают абсолютный процесс разрушения всех живых микроорганизмов.

Проведение эффективной дезинфекции и стерилизации требует, прежде всего, тщательной очистки с целью удаления органических частиц и грязи с дезинфицируемых и стерилизуемых поверхностей. Фаза очистки включает механическое удаление частиц грязи с поверхностей при помощи щетки и последующее мытье с использованием мыла и детергентов.

В лабораторном животноводстве применяют следующие способы дезинфекции и стерилизации:

- дезинфекция путем протирания, при которой дезинфицируемый предмет с гладкой поверхностью протирается дезраствором. Методом протирания дезинфицируют поверхности стен, полов, дверей, стеллажей, окон, светильников, перфорированные воздухораспределители;
- дезинфекция путем распыления, при которой дезраствор наносится на поверхность при помощи механических распылителей. Для этих целей используют ранцевые распылители. Дезинфекцию проводят в защитной маске и очках;
- дезинфекция путем замачивания, при которой дезинфицируемые материалы помешаются в дезраствор и выдерживаются в нем в течение не менее четырех часов. С помощью этого метода дезинфицируются все предметы, не подлежащие автоклавированию и на которые дезраствор не оказывает разрушающего действия (клетки и инвентарь из полипропилена, резиновые пробки и др.). Метод замачивания используют при проведении за барьер через гидрошлюз предметов, не подлежащих стерилизации в автоклаве и газовой камере (емкости с дезрастворами и др.);
- стерилизация путем газации (фумигация) используется для стерилизации помещений, а также предметов, не подлежащих влажной дезинфекции и автоклавированию (транспортные клетки, канцелярские принадлежности, обувь и др.). Для фумигации помещений используют газ формальдегид. Метод газации применяют при проведении предметов за барьер с использованием газовых камер (формалиновая, этиленоксидная);
- стерилизация путем автоклавирования, при которой через проходной паровой автоклав высокого давления в «чистую» зону проводят-

ся постоянно используемые материалы (клеточное оборудование, подстилочный материал, санитарная одежда, корм и др.).

Ежедневно проводится влажная уборка полов в комнатах для содержания животных с использованием дезинфицирующего средства. Еженедельно проводится влажная уборка комнаты с мытьем стен, дверей, решеток воздуховодов с применением дезсредств. Ежеквартально или по окончании исследования проводится генеральная уборка комнаты (в отсутствии животных в комнате). Все поверхности комнаты обрабатываются дезсредством при помощи распылителей.

Уборка коридоров в «чистой» зоне содержания животных производится с той же частотой и теми же методами, что и комнаты содержания животных. Ежедневно после окончания работ в чистой зоне в «грязном» и «чистом» коридорах и «чистой автоклавной» включается УФ.

Комната хранения корма и подстила обрабатывается. Один раз в 1,5 месяца проводится генеральная обработка комнаты.

Санитарную обработку пола в действующем санпропускнике проводят ежедневно в конце рабочего дня. Еженедельно проводят полную санитарную обработку пола, стен и поверхностей. Ежеквартально проводится генеральная уборка и смена санпропускников. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Обработка инвентаря. Швабры, находящиеся в комнатах содержания животных и во вспомогательных помещениях, ежедневно обрабатываются тем же дезраствором, который используется для санитарии данной комнаты. Еженедельно производят санитарную обработку всей поверхности швабр протиранием дезраствором. Ежемесячно все швабры выносят из «чистой» зоны в моечно-стерилизационный блок и подвергают обработке полным погружением в дезраствор. Дезраствор для мытья полов и поверхностей в зоне содержания животных наливается в клетки, используемые специально только для мытья. После использования клетки для мытья полов через грязный коридор выносятся на мойку, где моются и стерилизуются автоклавированием. Плоские мопы и тканевые салфетки ежедневно выносят из «чистой» зоны через «грязный» коридор после завершения рутинной санитарной обработки помещений. Мопы и салфетки стирают и стерилизуют автоклавированием.

Для уборки комнат содержания животных используются швабры с отжимом. В каждой комнате имеется своя швабра, которая не выносится в другие комнаты. В качестве емкости для мытья используются специально предназначенные для этого клетки, которые ежедневно вносятся в комнату из чистой автоклавной и выносятся из комнат через грязный

коридор вместе с использованным дезраствором. Отдельные швабры используются также в «чистой» автоклавной, в «чистом» и «грязном» коридорах.

Санобработка оборудования клеток. Специальные кормушки для клеток не используются. Решетки и разделители для корма обрабатываются еженедельно. Мытье осуществляется автоматически в моечной машине. Вымытые крышки клеток и их принадлежности сушатся на полке для сушки и затем автоклавируются.

Методы и частота обработки поилок. Поликарбонатные бутылочки меняются не реже одного раза в 4 дня, а при необходимости чаще. Поилки моются автоматически в моечной машине или вручную ершиком с использованием моющего средства с дальнейшей промывкой в проточной воде. После мытья бутылочки сушатся в сетчатых корзинах и потом автоклавируются.

Санобработка клеток для транспортировки животных, оборудования и транспорта. Картонные транспортные коробки вторично не используются и уничтожаются.

Контроль эффективности санобработки клеток производится визуально. Температурный режим работы автоклавов контролируется ежедневно при помощи поверенного термометра и химических индикаторных полосок. Ежегодно эффективность работы автоклавов должна контролироваться с помощью биотестов лаборатории Департамента санитарно-эпидемиологического надзора Минздрава РФ. Кроме того, работа автоклавов оценивается по результатам проверки на стерильность корма и подстила.

Все работы по содержанию животных и уходу за ними независимо от их категорий качества должны проводиться с соблюдением профилактических гигиенических мер, направленных на защиту от занесения и распространения болезнетворных агентов.

Профилактические гигиенические мероприятия в производственных помещениях «чистой» зоны, в помещениях, приравненных к ним по санитарным требованиям (лаборатории, операционные и др.), в помещениях «грязной» зоны проводятся в соответствии с графиком, предусматривающим периодичность работ, а также последовательность выполнения отдельных рабочих этапов и процедур. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Режим уборки

Работы по уборке и дезинфекции помещений проводятся ежедневно и в конце каждой недели.

В помещениях для животных ежедневно перед началом работ проводится влажная уборка с использованием свежеприготовленного дезраствора. В течение рабочего дня поддерживается чистота пола.

В конце рабочего дня специально предназначенной для этого щеткой обметаются стеллажи, тележки, пол подметается щеткой, после чего производится влажная уборка – протираются дезраствором стеллажи, тележки, дверные ручки, поверхности оборудования, пол протирается влажной тряпкой, смоченной дезраствором. Затем все орудия чистки – щетки, швабры, совок для мусора окунают в дезраствор, затем дезраствор выливают в раковину, при этом раковина очищается и дезинфицируется.

В конце недели помимо регулярной ежедневной уборки и дезинфекции проводят более тщательную уборку и дезинфекцию, дополнительно к перечисленным процедурам тряпкой, смоченной дезраствором, протирают перфорированные заслонки вентиляционных каналов, поверхности стен, дверей, светильников.

Генеральная уборка, дезинфекция и стерилизация помещений для животных проводится один раз в 6–8 месяцев, из помещения удаляются все животные, выносится все переносное оборудование. Помещение герметизируется (двери плотно закрываются, при необходимости щели заклеиваются клейкой лентой, задвижки приточной и вытяжной вентиляции закрываются). Проводится тщательная уборка и дезинфекция помещения с заключительной его стерилизацией путем фумигации формальдегидом. Через 24 часа после начала фумигации следует открыть задвижки приточной и вытяжной вентиляции, после чего пары формалина вытягиваются из помещения в течение 48 часов. При этом одновременно происходит дезинфекция воздуховодов. Персонал, проводящий газовую стерилизацию, должен быть обеспечен противогазами и прорезиненной защитной одеждой. Животные заселяются в помещение только после получения результатов микробиологического контроля. При положительных результатах контроля процесс стерилизации повторяется.

Проведение уборки и дезинфекции «чистых» служебных помещений, расположенных внутри барьерной зоны, а также помещений «чистой» части шлюза для персонала (душевая, «чистая» раздевалка, туалет) является обязанностью работников «чистой» зоны. Эти работы выполняются работниками по графику. Ежедневная, еженедельная и генеральная уборки, дезинфекция и стерилизация служебных помещений проводятся так же, как и в помещениях для животных.

Уборка и дезинфекция помещений «грязной» зоны входят в обязанности работающего там персонала. Работы по уборке и дезинфекции проводятся ежедневно, еженедельно и один раз в 6–8 месяцев

Ежедневные и еженедельные работы предполагают подметание, сбор и вынос мусора, протирание полов, окон, дверей, оборудования, мебели дезраствором (например, 2–5% раствор гипохлорита натрия, 2–3% раствор хлорамина).

Полугодовые генеральные уборки административных, хозяйственных помещений, коридоров «грязной» зоны проводятся с обязательным смешением оборудования, мебели и обеспечением доступа ко всем местам, не подвергающимся ежедневной промывке и дезинфекции. Проводится комплекс мероприятий по уничтожению диких грызунов и насекомых. Все помещения подвергаются фумигации формалином.

Уборка и дезинфекция помещений системы вентиляции и кондиционирования воздуха проводится персоналом, обслуживающим эти помещения.

Кроме регулярной ежедневной уборки и дезинфекции один раз в 6-8 месяцев должна проводиться генеральная уборка со смещением всех передвижных устройств, оборудования и мебели, пыль в помещении удаляется при помощи пылесоса, пол протирается дезраствором. Стерилизация формальдегидом производится только перед пуском системы в эксплуатацию, а также в случае специальных распоряжений о проведении ветеринарно-санитарных гигиенических мероприятий. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Контроль за наличием вредителей (грызунов, вредных насекомых)

Дератизация и дезинсекция проводятся по графику государственным дезинфекционным предприятием по договору. Пестициды, хлор- и фосфорорганические препараты не применяются. Раз в месяц приманки раскладываются в следующих помещениях:

– подвал здания,
– моечно-стерилизационный блок,
– комната хранения корма и подстила,
– технологический этаж,
– места рядом с входами в здание.

Дезинсекционные мероприятия проводятся с помощью специальных средств. Для оперативного уничтожения летающих насекомых, проникших с улицы, рядом с комнатой хранения корма и подстила и на технологическом этаже установлены световые ловушки для насекомых.

Инструктаж сотрудников, работающих с животными. Сотрудники предупреждаются о проведении дератизации и дезинсекции. Непосредственно в комнатах содержания животных родентициды и инсектициды не используются. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Обеспечение ухода при авариях, в воскресные дни и во время отпусков

Уход в воскресные дни и во время отпусков. Если протокол исследования требует ежедневного наблюдения за животными, рутинные мероприятия по уходу выполняются техническим персоналом согласно графику работы, невзирая на воскресные и праздничные дни. Если протокол исследования не требует ежедневного наблюдения за животными, то рутинные мероприятия по уходу в выходные дни не выполняются. Перед выходными днями животным в кормушки закладывается дополнительное количество корма (в соответствии с суточными нормами кормления). Рутинные мероприятия в праздничные дни проводятся техническим персоналом согласно графику работы, утвержденному ветеринарным врачом лаборатории. График работы в праздничные дни и график отпусков сотрудников составляется таким образом, чтобы рутинные мероприятия по уходу за животными выполнялись в полном объеме.

Координаты и телефоны руководителей исследований, ветеринарного врача известны техническому персоналу и находятся в доступном месте. Также у службы безопасности на центральном пульте наблюдения имеются предписания по поведению в аварийных ситуациях, список адресов и номеров телефонов ответственного персонала, включая персонал инженерной службы.

Контроль за работой механических систем, обеспечивающих поддержание параметров микроклимата в комнатах содержания животных, осуществляется дежурным охранной службы круглосуточно. Специальные звуковые и световые сигналы предупреждают дежурного охранной службы о возможности возникновения аварийных ситуаций. Дежурный незамедлительно ставит в известность об этом ответственный обслуживающий персонал инженерной службы.

Аварийные мероприятия. В корпусе должна быть автоматическая противопожарная система, включающая в себя систему предупреждения о задымлении и систему тушения огня. При срабатывании сигнализации пожарной тревоги на центральном охранном пульте дежурный охранной службы действует в установленном порядке – вызывает пожарную службу, информирует главного и дежурного инженеров, заведующего лабораторией и службу охраны труда. Телефоны и координаты всех ответственных лиц и служб должны быть в доступном месте.

При возникновении очага возгорания в комнатах содержания животных, животные эвакуируются в другие помещения, если эти действия не опасны для жизни персонала. Сотрудники эвакуируются через ближайший выход.

При опасном воздействии токсических веществ сотрудники немедленно эвакуируются из зоны воздействия на открытый воздух. Информируются все ответственные службы. Устанавливается степень опасности, и предпринимаются меры защиты, при необходимости вызывается «скорая помощь». При необходимости животные также могут быть эвакуированы.

Утилизация отходов

Подстилка и мусор. Клетки с грязной подстилкой вывозятся из комнат содержания животных в «грязный» коридор и далее в моечный блок, где подстил ссыпается вручную в бумажные мешки для мусора. Закрытые мешки хранятся в специальном помещении и вывозятся на сжигание в крематорий один раз в неделю.

Трупы животных. Трупы животных помещаются в полиэтиленовые пакеты и хранятся в морозильной камере (-20^{o}С) в комнате сбора отходов. Трупы, подлежащие вскрытию, помещаются в холодильник на +2 –+8 не более чем на 12 часов. Еженедельно трупы вывозятся на сжигание в крематорий.

Вредные/опасные отходы собираются и хранятся до вывоза на уничтожение в комнате сбора отходов согласно инструкциям отдела охраны труда и техники безопасности с соблюдением правил хранения соответствующих групп реактивов (использование герметичных промаркированных емкостей для отдельных групп отходов, вытяжных шкафов для летучих токсичных отходов). Вывоз отходов может осуществляться на промежуточный склад еженедельно, а затем со склада утилизироваться централизованно специализированной техникой. Факт проведения данных мероприятий должен фиксироваться в лабораторном журнале, который должен храниться в архиве ЭБК не менее 3 лет после окончания исследования.

Устройство播 вивариев

Корпус, в котором содержат лабораторных животных, должен быть специально спланированным, в том числе и для проведения исследований на животных. В корпусе должны быть: двухкоридорная барьерная зона содержания животных, лабораторные и технологические помеще-

ния. Комнаты для содержания лабораторных животных располагают в «чистой» зоне, должна быть зона между «чистым» и «грязным» коридорами и комнаты для содержания лабораторных животных в краткосрочных экспериментах в конвенциональной зоне. Комнаты содержания лабораторных животных отделяют от лабораторных и технологических помещений системой коридоров и тамбуров.

Комнаты содержания животных должны иметь сообщение с «чистой» и «грязной» зонами. Полы покрывают композицией повышенной износостойкости. Стены выполняют специальными стеновыми панелями. Потолок – подвесной, алюминиевый, в который встраивается решетка из нержавеющей стали приточной вентиляции и светофильтры из матового стекла. Стыки стеновых панелей внутренних стен провариваются. Примыкание поверхности пола к стенам выполняется монолитно. Стыки потолочных панелей герметизируются универсальным герметиком. Для защиты поверхности стен от механических повреждений устанавливают ограничители (бампера).

Комнаты краткосрочного содержания животных в экспериментах, а также «чистый» и «грязный» коридоры должны соответствовать выше описанным требованиям.

После окончания длительного исследования для эвтаназии и некропсии, а также для проведения кратковременных исследований животные транспортируются из комнат содержания барьерной зоны в процедурные комнаты. Транспортировка животных по коридорам общего пользования осуществляется в клетках содержания на стеллажах или передвижных тележках.

Двери в «чистый» и «грязный» коридоры оборудуются замками и медицинскими ручками.

В комнатах содержания животных водопровод и дренаж отсутствуют. В помещении моечного блока оборудуются дренажные люки, представляющие собой металлические решетки диаметром 30 см с затвором и стоком и отдельно стоящий канализационный слив для отходов. Водопровод в моечном блоке состоит из трубопровода горячей воды и трубопровода холодной воды. Канализационные стояки – из литых чугунных труб с антикоррозийной защитой.

Стены в помещениях содержания животных и местах санобработок имеют специальное покрытие (водоотталкивающее, неабсорбирующее, резистентное к ударам) с проваренными швами. В помещениях моечно-стерилизационного блока стены такие же, как в комнатах содержания животных. В санпропускниках стеновые панели также покрыты пластиковым покрытием или керамической плиткой, устойчивыми к влаге.

Потолки в комнатах содержания животных – подвесные, выполненные из алюминиевых элементов с термоизоляцией, с встроенными осветителями, которые обслуживаются с верхней стороны, водонепроницаемые. Все соединения и примыкания к стенам герметизированы универсальным герметиком.

В моечно-стерилизационном блоке потолок может быть выполнен из сборных железобетонных плит, являющихся наполнителем конструкции здания. В санпропускниках – подвесные потолки из пластиковых элементов, герметично прилегающих к стенам и друг другу, со встроенными водонепроницаемыми осветителями.

Комнаты содержания животных относятся к системе Р1 вентиляции и кондиционирования воздуха. Система обеспечивает 100% приток свежего воздуха, оснащена тремя ступенями фильтрации класса EU3, EU7, EU12 (HEPA-фильтр) и поддерживает следующие параметры среды:

– Температура: 20–23°С
– Относительная влажность: 50-60%
– Избыточное давление воздуха в комнатах относительно «чистого» и «грязного» коридоров 2–10 Па.
– Кратность воздухообмена: 10–15 объемов помещений в час.

Энергоснабжение и освещение

Установленные розетки и выключатели выполняют в полугерметичном исполнении. Осветители находятся над подвесным потолком, герметично закрыты и подвержены влажной обработке. Корпус биомедицинских исследований должен быть подсоединен к аварийной дизель-генераторной установке, которая автоматически вступает в работу через несколько секунд после пропадания напряжения в основной сети. Это необходимо для предотвращения гибели животных вследствие нарушения электроснабжения.

Контроль шума

Материалы стеновых покрытий, потолка, дверей в комнатах содержания животных должны обладать повышенной звуконепроницаемостью. Архитектурная конструкция коридоров и тамбуров с двойными дверями помогает уменьшить распространение звука. Все передвижные механизмы и тележки снабжены колесами с резиновым покрытием.

Помещения для санобработки клеток

Планировка моечно-стерилизационного блока должна позволить направить поток материалов в одну сторону и развести чистые и гряз-

ные потоки. Грязные материалы и оборудование вывозятся из зоны содержания животных через «грязный» коридор и промежуточную шлюзовую комнату в моечно-стерилизационный блок. Инвентарь сортируется, грязный подстил собирается в мешки для отходов, которые помещаются в комнату сбора отходов. Стеллажи обрабатывают на месте, клетки и бутылочки поступают на мытье в соответствующие комнаты. Металлические аксессуары – на машинное мытье. Грязная одежда персонала – в комнату на стирку. Вывоз/вынос чистого материала осуществляется через другие выходы из этих комнат. Подстил и корм заносятся из комнаты хранения в стерилизационный блок.

Безопасность

Территория, на которой расположен корпус биомедицинских исследований, должна быть ограждена и защищена от внешнего доступа. Порядок входа на территорию строго определен.

Наружный периметр корпуса биомедицинских исследований должен быть оборудован системой охранной сигнализации, исключающей не только проникновение посторонних лиц непосредственно в здание, но и осуществляющей санкционированный доступ сотрудников в помещения конкретных охраняемых зон (подвал, технологические помещения). Внутри здания установлена проводная система контроля и управления доступом. На дверях конкретных помещений здания установлены электромеханические замки с индивидуальными контроллерами, обеспечивающими управление замками по сигналам от центрального процессора после считывания информации с бесконтактных карт доступа.

Система регламентирует и обеспечивает пропуск сотрудников в отдельные помещения корпуса, осуществляя идентификацию по бесконтактным электронным картам по принципу «доступ разрешен – доступ запрещен» с соответствующей регистрацией времени прохода. Система регистрирует все происходящие в ней события как по факту, так и по времени и позволяет получать отчеты о событиях в системе за интересующий период времени (проходы сотрудников, попытки нарушения режима контроля доступа, постановка и снятие помещений с охраны, тревожные события). Система энергонезависима и укомплектована источником бесперебойного электропитания.

Режим работы

Работа по уходу за лабораторными животными всех категорий строится в соответствии с распорядком дня и регламентом, утвержденными руководителем учреждения. Персонал, обслуживающий животных, должен систематически выполнять следующие виды работ:

- ежедневно до начала работ по уходу осматривать клетки с целью выявления заболевших или погибших животных, родов; регистрировать рождение и все случаи гибели животных в формах первичного учета;
- выбраковывать больных животных; погибших и выбракованных больных животных передавать на исследование в КДЛ;
- систематически выбраковывать племенных и подсосных животных, пополнять выбракованных племенных животных;
- проводить отъем от матки молодняка по окончании подсосного периода (мыши, крысы – 28–31 день; хомяки – 21–29 дней; морские свинки – 27–29 дней; кролики – 40–45 дней; кошки – 52–56 дней; собаки – 45 дней; миниатюрные свиньи – 45 дней) и формировать по полу группы из отъемышей;
- еженедельно заменять грязные клетки на чистые (при необходимости чаще);
- заполнять свежей водой бутылки для поения с таким расчетом, чтобы животные были постоянно обеспечены питьевой водой;
- заполнять кормом кормушки с таким расчетом, чтобы было обеспечено постоянное наличие кормов вволю;
- пересаживать, взвешивать, упаковывать животных в транспортные клетки для транспортировки в соответствии с планом реализации животных;
- ежедневно записывать показатели температуры и влажности воздуха в помещении;
- ежедневно проводить влажную уборку помещений с использованием дезсредств;
- ежедневно дезинфицировать оборудование, используемое в работе: подсобные тележки, весы, ведра, баки для корма (после опорожнения), кормораздаточные лопатки, пинцеты и ножницы (после каждого использования);
- ежедневно заполнять этикетки и сводки о движении поголовья;
- в соответствии с планом проведения санитарно-гигиенических мероприятий участвовать в проведении дезинфекции помещений.

Помещение для животных должно быть обеспечено следующим оборудованием и материалами (Таблица 30).

Подстилка для лабораторных животных должна отвечать требованиям технических условий «Материал подстилочный из древесной щепы для лабораторных животных» ТУ 5313-001-1897639-92. В качестве подстилки могут использоваться опилки, стружки или мелкая щепа (может

быть разной по форме, длина 5—20 мм, толщина 1—2 мм, влажность максимальная 8%) из экологически чистой древесины лиственных пород. Не допускается использование подстилки из химически обработанной древесины, а также из древесины хвойных пород. Допускаемый уровень загрязненности подстилки химическими веществами и тяжелыми металлами представлен в Таблице 31.

Таблица 30

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОРУДОВАНИЯ, СРЕДСТВ И МАТЕРИАЛОВ В ПОМЕЩЕНИИ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Наименование	Количество
Клетки в комплекте. В комплект одной клетки входят: – ванночка из полипропилена или поликарбоната; – крышка из нержавеющей стали с бункером для корма; – бутылка для поения; – канюля; – резиновая пробка; – держатель для этикетки из нержавеющей стали	Количество клеток определяется размерами помещений. Оно не лимитируется и зависит от технологической возможности обеспечить нормативные показатели микроклимата
Стеллажи настенные или передвижные	по размерам помещения и необходимости
Бак для воды	1
Стол для весов	1
Весы	1
Контейнер для кормов	1
Кормораздаточная лопатка	1
Ножницы	1
Пинцет	1
Ведро	1
Швабра	1
Совок	1
Тряпка половая	1
Тряпка для протирания пыли	I
Щетка с ручкой	1
Полотенце	1
Дезковрик	1
Термометр электронный для измерения минимальной и максимальной температур	1
Психрометр	1
Шариковая ручка	1
Журнал для записи температуры и влажности воздуха	1
Бланки, этикетки	по необходимости
Дезинфицирующие растворы	по необходимости

Таблица 31

УРОВЕНЬ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ПОДСТИЛОЧНОГО МАТЕРИАЛА

Виды загрязнений	Концентрация, мг/кг не более
Химические вещества:	
гексахлоран	0,02
ДДТ	0,02
ДЦД	0,02
ДДЕ	0,02
полихлорированные	0,02
бифенилы	0,02
Тяжелые металлы:	0,02
свинец	0,05
кадмий	0,01
ртуть	0,01

Количество пыли не должно превышать 1%. Поступившая подстилка проверяется на наличие пыли. В большом количестве мелкодисперсная пыль на частицах подстилки оказывает вредное влияние на организм животного, вызывая заболевания и даже падеж молодняка. Кроме того, пыль, распространяясь по воздуху, создает загрязнение помещения и отрицательно сказывается на работе оборудования, подстилка должна просеиваться как для освобождения от пыли (вне помещения питомника или ЭБК), так и от более крупных примесей (куски дерева, металла, бумаги и др.).

При поступлении из одного и того же источника подстилка подвергается лабораторному контролю не менее двух раз в год.

Перед употреблением подстилка в обязательном порядке автоклавируется при температуре 132°С и давлении 2 атм. в течение 20 минут с последующей сушкой в течение 30 минут, что обеспечивает надежную стерилизацию.

После охлаждения и сушки подстилка рассыпается в стерильные клетки толщиной не менее 1 см, в которые пересаживают животных из грязных клеток.

Для улучшенных конвенциональных и СПФ-животных воду необходимо стерилизовать в автоклаве при температуре 121°С и давлении 1,2 атм. в течение 45 минут, для стерилизации бутылки без пробок, заполненные водой, расставляют в проволочные корзины и помешают в автоклав, пробки автоклавируются отдельно. При смене все старые бутылки заменяются. Доливать старую бутылку свежей водой не допускается.

Кормление

Кормление рекомендуется осуществлять полнорационным гранулированным комбикормом, обеспечивающим физиологические потребности организма в питательных, минеральных веществах, витаминах, микроэлементах и энергии и исключающих необходимость введения в корм дополнительных ингредиентов. Диеты рассчитываются с учетом видовых и физиологических (разведение, рост, взрослое состояние) особенностей животных. В мировой практике производятся и используются стандартные полнорационные гранулированные корма специально для каждого вида животных. Для кормления мышей и крыс обычно используется один и тот же корм, который допустимо использовать для кормления хомяков. Используются также диеты, учитывающие генетические особенности метаболизма отдельных линий животных. Кормление животных при их воспроизводстве и использовании в экспериментах должно производиться одинаковым кормом.

Кормление лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кошек, собак) всех категорий должно осуществляться полнорационным гранулированным комбикормом, изготовленным в соответствии со стандартом «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных». Гранулированный комбикорм следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, незараженных амбарными вредителями и дикими грызунами складских помещениях, не имеющих посторонних запахов. Оптимальные условия хранения при температуре +5°С и влажности 50–60%.

Перед скармливанием корм в обязательном порядке подвергается стерилизации в автоклаве с использованием вакуума при температуре 121°С и давлении 1,2 атм. в течение 20 мин. Корм автоклавируется в специальных металлических контейнерах с перфорированными стенками. Из контейнеров корм в теплом состоянии во избежание слипания гранул пересыпается в транспортные клетки со специальными емкостями. В кормушки корм раздается дозировочной кормораздаточной лопатой, переносить корм из одной клетки в другую запрещается. При смене клеток оставшийся корм использованию не подлежит. Запрещается также класть в кормушки упавший на пол корм.

Кормление мышей, крыс и хомяков всех категорий производится полнорационным гранулированным кормом ПК 121-10 (ГОСТ-Р 50258-92) или аналогичного иностранного производства с предварительной стерилизацией.

Кормление морских свинок и кроликов I и II категории в связи с отсутствием производства корма в соответствии со стандартом ГОСТ-Р50258-92 временно допускается гранулированным комбикормом ПК 120-5 или аналогичного иностранного производства с предварительной стерилизацией.

Кормление кошек и собак производится сухими сбалансированными кормами, изготовленными из натуральных ингредиентов.

Кормление мини-свиней осуществляется стандартными полнорационными гранулированными комбикормами, изготовленными для кормления пользовательских пород свиней (племенное разведение). С учетом массы, физиологического состояния и половозрастной принадлежности животных в комбикорм добавляется мясокостная мука, сухое молоко, корнеклубнеплоды. При необходимости сухие корма автоклавируются, корнеклубнеплоды отвариваются.

Кормление кур осуществляется по рецептурам, утвержденным МСХ СССР и РФ (ГОСТ 18221-72) и нормативам затрат в соответствии с Приказом МЗ СССР №1179 от 10.10.1983 г., и рекомендациями МСХ РФ с использованием:

- для взрослых кур-несушек комбикормов ПК-1-2 и ПК-1-5 и премикса П-1-L. Норма кормления – 190 г в сутки на голову.
- для молодняка в возрасте 1–150 дней ПК-2-3 и Пк-3-2 и премикса П-2-1. Норма кормления – 28–90 г в сутки на курочку и 31–100 г в сутки на одного петушка, в неограниченном количестве даются мел, ракушка, гравий, перед употреблением корма автоклавируются.

Контроль качества корма. Поступающий корм должен иметь на каждом мешке сертификат с указанием названия и адреса производителя, номер ГОСТа и рецептуры корма, даты изготовления. Контроль качества корма производится на его соответствие показателям рецептуры и в целом требованиям ГОСТ производимого корма для всех видов лабораторных животных по показателям и с использованием методов в соответствии с приложением. Сроки хранения кормов определяются согласно рекомендациям изготовителя.

Гранулированные комбикорма следует хранить в сухих, чистых, хорошо проветриваемых, не зараженных амбарными вредителями и дикими грызунами складских помещениях, не имеющих посторонних запахов. Оптимальные условия хранения при температуре +5°С и влажности 50–60%.

Гарантированный срок хранения гранулированного комбикорма ПК 121-10 при температуре помещения:

+6–+ 10°С – 6 месяцев;

+11–+18°С – 4 месяца.

Гранулированный комбикорм для морских свинок и кроликов ПК 120-5 при температуре +10°С хранится 3 месяца.

Работа с популяциями

При работе с лабораторными животными необходимо правильно их маркировать, а также регулярно вести индивидуальные записи по состоянию здоровья, проводимым манипуляциям и т.п.

Методы идентификации каждого вида

В качестве методов идентификации крыс и мышей может использоваться маркировка ушей иссечением фрагмента ушной раковины или ее перфорированием или цветные метки на теле (бриллиантовым зеленым, раствором фукарцина или специальным нетоксичным маркером).

Идентификационная карточка на клетках с животными, не участвующими в исследовании, содержит следующую информацию:

Вид/Линия
Пол
Номер клетки
Дата получения
Возраст при получении
Предназначение (номер исследования, резерв или др.)
Количество животных

Идентификационная карточка на клетках с животными, во время исследования содержит следующую информацию:

Вид/Линия
Пол
Номер клетки
Код исследования
Номер протокола КБЭ
Руководитель исследования
Группа
Номера и метки животных в клетке

Ведение постоянных индивидуальных записей

В листе рутинных манипуляций, выполняемых в комнате содержания животных, отмечаются отклонения в состоянии здоровья животных, о чем ставятся в известность ветеринарный врач и руководитель исследования. Кроме того, во время проведения исследований проводится индивидуальный клинический осмотр животных с регистрацией показателей в «карте клинических признаков заболевания». В зависимости от требований протокола исследования может вестись индивидуальная карта наблюдения за животным, в которую заносится вся информация о животном и его состоянии здоровья при получении, во время карантина и во время исследования. За ведение индивидуального наблюдения за животным отвечают руководитель исследования и ветеринарный врач. Все данные индивидуального наблюдения за животными хранятся в соответствующем разделе документации по исследованию.

Ветеринарная помощь

В виварии должна быть предусмотрена возможность оказания ветеринарной помощи, включая выходные и праздничные дни. Должен быть план ветеринарных мероприятий. Ежедневно животных должен осматривать ветеринар.

Компоненты ветеринарной помощи:

- необходимое оборудование, персонал и службы для обеспечения основных принципов содержания;
- использование соответствующих методов для предупреждения заболеваний и контроля здоровья лабораторных животных;
- наличие службы оповещения в праздничные и выходные дни;
- ежедневный ветеринарный осмотр;
- способность исследователей оказать ветеринарную помощь, использование правильных методов удержания, иммобилизации, анестезии, анальгезии и эвтаназии при выполнении научных манипуляций;
- адекватная премедикация, хирургическая и послеоперационная помощь.

Глава 7

Приобретение, транспортировка и карантинирование лабораторных животных

Для проведения экспериментальной работы лабораторных животных закупают и транспортируют в соответствии с ветеринарными и биоэтическими требованиями.

Документация и соглашения при покупке животных

Покупка животных питомниками (вивариями) должна производиться только из известных источников. Все животные должны иметь сертификаты качества. При покупке животных за рубежом необходимо соблюдать международные соглашения по продаже и покупке животных, а также ветеринарные требования при пересечении границы. Все закупаемые животные должны проходить карантин.

Транспортировка лабораторных животных

Транспортировка является стрессовым фактором и существенно повышает риск инфекционного заражения лабораторных животных и поэтому должна выполняться в соответствии с нижеизложенными правилами.

При транспортировке лабораторных животных продолжительностью не более 12 часов используются транспортные клетки, изготовленные по специальной технологии из многослойного картона. Размеры клеток для мышей 400×140 мм, хомяков – 400×280×180 мм. Для других видов животных используются клетки большего размера, на противоположных концах клетки имеются отверстия для обмена воздуха, которые закрепляются

Таблица 32

НОРМЫ РАЗМЕЩЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ТРАНСПОРТНЫХ КЛЕТКАХ

Вид животных	Вес, г	Максимальное количество животных в 1 клетке	Площадь пола на 1 животное, см^2	Высота клетки, см
Мыши	15–20	25	20	10
Крысы	20–35	25	26	13
	35–50	25	40	13
	50–150	25	52	13
	выше 150	12	100	13
Хомяки	30–50	12	32	13
	50–60	12	66	13
	60–100	12	136	13
Морские	170–280	12	90	15
свинки	260–420	12	160	15
	выше 420	12	230	15
Кролики	менее 2,5	4	770	20
(кг)	2,5–5,0	2	970–1160	25
	выше 5,0	1	1400	30

пластмассовой сеткой, вставленной между внутренними стенками клетки. При транспортировке животных СПФ-категории воздушные отверстия клеток покрываются воздухофильтрующим материалом – фильтром высокой очистки, аналогичном по эффективности действия фильтрам, используемым для очистки воздуха при производстве СПФ-животных. При транспортировке улучшенных конвенциональных животных воздушное отверстие следует закрывать фильтром грубой очистки. При продолжительности транспортировки более 12 часов используются пластмассовые транспортные клетки. Воздушные отверстия клеток закрываются металлической сеткой и надежной фильтровальной тканью. При сборке клетки скрепляются специальными скрепками, щели заклеиваются клейкой лентой.

Нормы размещения лабораторных животных в транспортных клетках представлены в Таблице 32.

Заготовки картонных клеток хранятся в виде сложенных листов в обычном складском помещении. В «чистую зону» они передаются через формалиновую камеру стерильными, в складе «чистой» зоны хранить большее количество клеток, чем требуется на одну неделю, запрещается. После сборки в клетку помешается стерильная стружка слоем 1–2 см, на клетки наклеивается этикетка, в которой указывается:

– фамилия заказчика;
– наименование и адрес потребителя;

– символ линии или популяции транспортируемых животных, пол, весовая категория или возраст;
– количество животных;
– сертификат качества;
– дата упаковки и транспортировки;
– фамилия упаковщика или знак упаковочного цеха;
– адрес и наименование поставщика.

В приготовленную и снабженную этикеткой клетку помещаются животные в соответствии с нормой посадки. Если наружная температура выше +27°С или температура салона машины не отрегулирована и может достигать 27°С, то в клетку помещается только половина от нормативного количества животных.

При транспортировке продолжительностью более 12 часов в клетку помещается стерильный брикет в количестве суточной нормы, а в стерильную марлю или фольговый мешочек упаковывается брикетная смесь, увлажненная питьевой водой.

При транспортировке продолжительностью более 24 часов в клетку помещается корм в количестве 1,5 суточной нормы, а для удовлетворения животных в воде кладутся очищенные от кожицы простерилизованные яблоки или картофель.

После помещения животных транспортная клетка закрывается крышкой, все возможные щели заклеиваются клейкой лентой, и передается через воздушный шлюз водителю транспортной машины, одновременно водителю передаются накладные в трех экземплярах, в которых указываются количество и качество животных.

Погрузка клеток производится водителем и работником по отправке животных в отапливаемом и проветриваемом гараже или отправочной. Салон автомашины должен быть тщательно очищен и продезинфицирован. Клетки в салоне размещаются так, чтобы воздушные отверстия оставались свободными. Во время транспортировки в салоне автомашины поддерживается температура 17–27°С (оптимально 19±2°С). Салон постоянно проветривается, летом транспортировка проводится по возможности рано утром.

В одном салоне допускается совмещение следующих видов животных по группам: одна группа – мыши, морские свинки, кролики, другая – крысы, хомяки.

Передача животных СПФ-категории в «чистую» зону ЭБК или питомника производится через воздушный шлюз с УФ-облучением. Поверхность клетки тщательно протирается губкой, смоченной дезинфицирующим раствором. Клетки предварительно проверяются на наличие повреждений, животные из поврежденных клеток не принимаются.

Дверка шлюза отворяется с наружной стороны («грязной»). Клетка помещается внутрь шлюза и закрывается его наружная дверка, открывается дверка шлюза, ведущая в «чистую» зону. Пинцетом, смоченным в дезинфицирующем растворе, открывается крышка клетки. Другим пинцетом животных по одному перемещают в заранее подготовленные клетки, клетки с животными помещаются в отдельную комнату «чистой» зоны для прохождения карантина, пустые транспортные клетки удаляются через наружную дверь шлюза, и в него помещается очередная продезинфицированная клетка с животными, таким образом, проводится шлюзование до распаковки последней транспортной клетки.

Использованные транспортные клетки передаются в моечно-дезинфекционное отделение и сжигаются, повторное использование транспортных клеток категорически не допускается.

Для транспортировки лабораторных животных используется специальная автомашина с установленным оборудованием для поддержания в салоне микроклимата (температура, вентиляция) на требуемом уровне, салон оборудуется полками для размещения транспортных клеток. Автомашину, предназначенную для транспортировки животных, запрещается использовать для других целей.

Чистка и дезинфекция автомашины для перевозки животных являются обязанностью водителя, чистка и дезинфекция осуществляются после каждой транспортировки животных как конвенциональных, так и СПФ-категории.

Пол салона автомашины очищается с помощью швабры или пылесоса. Стены и пол салона для груза, так же как и пол кабины водителя, промываются и дезинфицируются влажной тряпкой, смоченной в дезрастворе.

Загрязнения маслом и жиром удаляются раз в неделю раствором моющего средства

Один раз в квартал или после перевозки инфицированных животных автомашина подвергается, кроме мойки и дезинфекции путем протирания, обработке парами формалина.

Пол в гараже ежедневно протирается раствором моющего средства и промывается водой, один раз в квартал гараж обрабатывается парами формальдегида.

Работа гаража должна регистрироваться в контрольном журнале, водитель должен заносить в контрольный журнал следующие данные:
– дата проведения дезинфекции;
– номер автомашины;
– время начала и конца проведения дезинфекции;
– использованные дезсредства и их концентрации;
– подпись водителя;

– подпись ответственного ветеринарного врача учреждения. Кроме записи в контрольный журнал, водитель должен занести те же данные в бортовой журнал автомашины.

Качество работ по чистке и дезинфекции транспортных средств и гаража должно не менее одного раза в неделю проверяться ветеринарным врачом учреждения, результат проверки следует занести в контрольный журнал с указанием даты и подписью.

Водители автомашин для перевозки животных обязаны при погрузках предъявлять бортовой журнал ответственному ветеринарному врачу, который обязан проверить санитарное состояние автомашины и результат проверки занести в бортовой журнал. Ветеринарный врач имеет право, при серьезных недостатках в санитарном состоянии, запретить погрузку животных до их устранения и распорядиться об удалении автомашины с территории учреждения.

Машинам, принадлежащим другим учреждениям, въезд на территорию питомника ЭБК не разрешается.

Карантин лабораторных животных

Конвенциональные животные, поступившие в питомник или ЭБК, предварительно содержатся в специальном карантинном отделении, помещение отделения должно быть изолировано от других помещений и должно иметь самостоятельную систему воздухообеспечения. Санитарно-гигиенические требования к карантинному отделению стандартные.

В питомниках и ЭБК барьерного типа обязательно предусматриваются карантинные отделения.

Карантинирование преследует следующие цели:

– регистрацию возможных проявлений инфекционных заболеваний животных, клинической манифестации латентно текущих процессов после стрессовой ситуации, каковой является транспортировка и т.д.;
– в случае возникновения инфекционного заболевания – диагностическое обследование животных, обеспечение безопасности персонала, основного поголовья животных и окружающей среды.

Для вновь поступивших животных общепринятыми являются следующие сроки карантина: мыши, крысы, хомяки, морские, свинки – 5–15 дней; кролики, кошки, собаки, мини-свиньи – 20–30 дней. Продолжительность карантина может быть увеличена руководителем карантинного отделения, в том числе и в случае подозрения на заболевание или выявления заболевания.

Уход за животными в карантинном отделении осуществляется персоналом, закрепленным за данным отделением и соблюдающим соответствующие меры предосторожности (работа в респираторах, перчатках, в спецобуви). Вход в карантинное отделение посторонним лицам и работающим в других помещениях категорически запрещается.

Животные в карантинном отделении содержатся в общепринятых стандартных клетках и в соответствии с нормативами плотности посадки. Запрещается содержание в одном помещении животных разных видов и разных сроков поступления.

Чистка, мойка клеток и другого инвентаря из карантинного отделения может производиться в общем дезинфекционно-моечном отделении только после предварительного обеззараживания, отходы также должны обеззараживаться и сжигаться.

В период карантина животные подвергаются ежедневному ветеринарному клиническому осмотру, результаты которого документируются в специальном журнале с указанием поставщика (название, адрес), даты поступления животных, их клинического состояния, состояния транспортных клеток.

Животные с подозрением на инфекционное заболевание подвергаются всестороннему лабораторному обследованию. В случае лабораторного подтверждения инфекционного заболевания животные данного поступления уничтожаются. В отношении собак, кошек, мини-свиней в зависимости от установленного заболевания сроки карантина могут продлеваться. Трупы обрабатывают дезинфектантами и сжигают.

Помещения карантинного отделения, оборудование, инвентарь после каждого случая выявления инфекционного заболевания подвергаются дезинфекции, после чего смывы с поверхностей стен, полов, окон, оборудования, а также воздух подвергают микробиологическому обследованию. В случае обнаружения возбудителей дезинфекцию повторяют до получения отрицательного результата.

При обнаружении инфекционного заболевания руководитель карантинного отделения письменно информирует об этом поставщика и региональную ветеринарную службу.

Карантин, адаптация и распределение животных, находящихся в эксперименте

Лабораторные животные, приобретенные для экспериментальных исследований, должны пройти карантин, адаптацию, осмотр ветврача, и только после этого на них будет возможно проведение исследований.

Прием и первоначальная оценка животных

Животные поступают в корпус биомедицинских исследований, заранее обработанные специальным дезраствором, например 0,5% раствором «Глютекса» и УФ. Картонные контейнеры обрабатываются со всех сторон 0,5% раствором «Глютекса» или «Аэродезином 2000». Персонал, получающий животных, переодевается в стерильную одежду: куртка, брюки, шапочка, маска, перчатки. Обработанные контейнеры заносятся в комнату с передаточным шлюзом, где вскрываются. Животные пересаживаются в чистую проавтоклавированную клетку, которая передается через передаточный шлюз. С обратной стороны (в «чистой» зоне), животные пересаживаются в подготовленные клетки содержания и помещаются в «карантинную» комнату (комната содержания животных, отведенная для адаптации). Разные виды животных помещаются в разные комнаты. Разные партии животных по возможности также содержатся в разных комнатах.

Карантинные помещения и процедуры для специально выращенных животных

После поступления животных в «чистую» зону содержания их размещают в комнатах, предназначенных для адаптации животных. Крысы и мыши разных партий помещаются в разные комнаты. Для животных, поступивших из собственного питомника, период адаптации (период от приема до использования животных в исследовании) составляет не менее 3 дней, специальные карантинные мероприятия не проводятся. Микробиологический контроль прибывших животных не проводится. Состояние здоровья оценивается по внешнему виду и проявлению клинических признаков заболевания.

Для животных, поступивших из других источников, порядок и длительность карантинных мероприятий определяются ветеринарным врачом лаборатории по согласованию с ветеринарной службой.

Карантинные помещения и процедуры для животных из случайных источников

Животные из случайных источников с неустановленным статусом здоровья в «чистую» зону не поступают. SPF-статус животных подтверждается документально поставщиком.

Изоляторы и процедуры для больных животных

Если появляются клинические признаки заболевания у животных, находящихся в условиях адаптации в «чистой» зоне, то животные немедленно выводятся из «чистой» зоны и подвергаются эвтаназии. Специальные изоляторы для больных животных не используются.

Периоды физиологической, психологической и пищевой адаптации

Перед началом исследования животные проходят период физиологической, психологической и пищевой адаптации не менее 3 суток при условиях содержания, описанных в Протоколе исследования.

Программа разделения животных по видам, источникам приобретения и состоянию здоровья

Животные SPF-статуса находятся в барьерной зоне содержания животных. Животные разных видов содержатся в разных комнатах. Основной принцип размещения животных – отдельное исследование – отдельная комната.

Животные для краткосрочных исследований содержатся в специально отведенных комнатах конвенциональной зоны.

Наблюдение, диагностика, лечение и контроль здоровья животных

Повседневное наблюдение за животными. Осмотр состояния здоровья животных проводится визуально персоналом, ухаживающим за животными. При наличии отклонений в состоянии здоровья животных, потреблении корма и питья делается отметка в Листе рутинных манипуляций по комнате и Протоколе обнаруженных отклонений в здоровье животных, о чем информируются ветеринарный врач и руководитель исследования.

Обеспечение ветеринарной помощью. Животным (крысам и мышам) с клиническими признаками заболевания ветеринарная медицинская помощь не оказывается. Если появляются клинические признаки заболевания у животных, находящихся в условиях адаптации в «чистой» зоне, то животные немедленно выводятся из «чистой» зоны и подвергаются эвтаназии. Если появляются клинические признаки заболевания у животных, находящихся в исследовании, такие животные изолируются в отдельные клетки, помещаются на отдельный стеллаж в помещении для исследования и находятся под наблюдением до принятия решения об их

участи (наблюдение до исчезновения клинических признаков болезни, лечение, эвтаназия). Решение об участи животных принимается руководителем исследования с учетом рекомендаций ветеринарного врача и утверждается заведующим лабораторией. Животные с признаками боли, дистресса, в тяжелом состоянии подвергаются немедленной эвтаназии. Могут быть проведены патоморфологические и/или бактериологические исследования павших или заболевших животных.

При проведении экспериментального исследования в случае необходимости животным оказывается медикаментозное лечение препаратами, разрешенными для применения в ветеринарии (кроме случаев, когда протоколом исследования не предусмотрено иное).

Ведение медицинских записей. При появлении клинических признаков заболевания стандартные записи включают:

– запись в Протоколе отклонения здоровья животного;
– записи осмотра животного ветеринарным врачом, описание клинических признаков заболевания и диагноз;
– записи дальнейшего наблюдения за животным, динамика проявления клинических признаков заболевания;
– запись о решении дальнейшей судьбы животного;
– запись о проводимом лечении;
– данные об эвтаназии и некропсии животного.

Программы профилактической медицины для каждого вида. Для содержащихся в «чистой» зоне животных превентивная программа заключается в следующем: раздельное содержание разных видов и партий животных, размещение прибывших животных в «карантинную» комнату, наличие барьерной системы: вход персонала через санпропускник, соблюдение однонаправленного потока людей и материалов по направлению «чистый коридор – комната содержания животных – грязный коридор», использование дезинфектантов и соблюдение программы санитарии. При проведении длительных исследований в комнату с экспериментальными животными помещаются дополнительные животные (sentinels), которые затем отправляются на проверку статуса здоровья.

Мониторинг состояния здоровья животных. **Мониторинг здоровья лабораторных животных включает в себя: серологические, бактериологические, паразитологические, патоморфологические исследования, которые выполняются на базе контрактных лабораторий.**

Глава 8

Биобезопасность при работе с лабораторными животными

Большое значение в получении лабораторных животных высокого качества и проведении экспериментов на них имеет подготовка персонала. Необходимо уделять особое внимание тому, чтобы было достаточное количество людей, обслуживающих животных в питомниках, экспериментально-биологических клиниках (увивариях), проинструктированных правильному обращению с животными. Кроме соблюдения правил гуманного обращения с животными необходимо соблюдать и правила личной безопасности.

Помещения для лабораторных животных

При проектировании помещений для лабораторных животных следует предусмотреть их изоляцию от персонала лаборатории в случае необходимости, а также возможность деконтаминации и дезинфекции.

Проектирование помещений для животных, так же как и лабораторий, должно осуществляться с учетом степени опасности исследуемых микроорганизмов; здесь также выделяют четыре уровня биологической безопасности. Во внимание принимаются и иные факторы, такие как объем и концентрация исследуемого патогенного агента, путь заражения животного и возможный путь выведения агента из организма животного. Учитывают особенности животного: его агрессивность или способность кусать или царапать, его природных экто- и эндопаразитов, зоонозные заболевания, которым подвержено данное животное, а также возможное распространение аллергенов.

Определенные требования существуют и к оснащению лаборатории, ее проектированию, причем меры предосторожности усиливаются по

мере возрастания уровня биологической безопасности лаборатории. Эти требования изложены и кратко представлены в Таблице 33.

Таблица 33

ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ И УРОВНИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ, СВОД ПРАВИЛ РАБОТЫ И ПЕРЕЧЕНЬ БЕЗОПАСНОГО ОБОРУДОВАНИЯ

Группа риска	Уровень безопасности	Лабораторная практика	Оборудование, обеспечивающее безопасность
I	1	Ограниченный доступ, защитная одежда и перчатки	Средства личной защиты и гигиены
II	2	Ограниченный доступ и знаки биологической опасности; защитная одежда и перчатки; деконтаминация отходов и клеток перед уборкой	I и II классы боксов биологической безопасности (БББ) для видов работ, сопровождающихся образованием аэрозолей; средства личной защиты
III	3	Контролируемый доступ; специальная защитная одежда; остальное, как для уровней 1 и 2	I и II классы БББ для всех видов работ; средства личной защиты
IV	4	Строго ограниченный доступ; 3-й уровень деятельности плюс помещения для переодевания и душевые; все отходы деконтаминируются перед удалением из помещения	Класс III БББ или ламинарные костюмы с положительным давлением

Уровни биологической безопасности

Уровень биологической безопасности 1

К этому уровню биологической безопасности относится большинство лабораторных животных (за исключением приматов), а также животных, зараженных инфекционными агентами группы риска 1. При работе с ними требуется хорошая микробиологическая техника (ХМТ).

Уровень биологической безопасности 2

Сюда относится работа с лабораторными животными, зараженными инфекционными агентами группы риска 2. Необходимо соблюдение следующих предосторожностей:

– на дверях и в соответствующих местах должны вывешиваться знаки биологической опасности;
– проектирование должно предусматривать эффективную очистку и уборку помещений;
– двери должны открываться и легко закрываться;
– отопление, вентиляция и освещение должны быть адекватными;

– при механической вентиляции она должна быть приточной и обеспечиваться путем выброса воздуха в атмосферу. Воздух не должен рециркулировать в остальных помещениях, т.е. используется система «тотального выброса»;
– доступ разрешается только ограниченному кругу лиц;
– содержаться должны лишь животные, используемые в эксперименте;
– должна быть программа наблюдения за членистоногими и грызунами;
– необходимо использовать средства защиты от насекомых;
– после использования рабочие поверхности следует деконтаминировать соответствующими дезинфектантами;
– боксы биологической активности уровней 1 и 2 должны быть приспособлены для работы с образованием аэрозолей;
– автоклав должен быть расположен в помещении или рядом с ним;
– подстилки из клеток животных удаляются с минимальным образованием аэрозолей или пыли;
– перед удалением подстилки все использованные материалы подлежат деконтаминации;
– материалы для автоклавирования или сжигания транспортируются в безопасных закрытых контейнерах;
– после использования клетки животных подлежат деконтаминации;
– трупы умерщвленных животных подлежат сожжению;
– должны быть предусмотрены устройства для мытья рук. Персонал должен мыть руки перед уходом из помещений, где содержатся животные;
– в помещении следует носить защитную одежду, снимаемую при уходе из лаборатории. Следует предусмотреть наличие перчаток;
– все травмы, даже незначительные, должны быть запротоколированы;
– в помещениях, где содержатся животные, запрещаются прием пищи и воды, курение, использование косметики.

Уровень биологической безопасности 3

Относится к работе с лабораторными животными, зараженными патогенными агентами группы риска 3. Приемлемы все рекомендации, разработанные для лабораторий, уровней биологической безопасности 1 и 2:

– доступ в лаборатории должен быть строго ограничен;
– помещения, в которых содержатся животные, должны быть отделены от остальной части лаборатории и вивария воздушным шлюзом с двумя дверями;
– при входе в помещения устанавливаются раковины для мытья рук и душ;
– должна быть предусмотрена механическая вентиляция с поступлением воздуха во все комнаты. Отработанный воздух фильтруется

через ВД-фильтры перед выбросом в атмосферу («полный выброс»). При проектировании системы предусматриваются устройства, препятствующие случайному обратному току воздуха и его нагнетанию ко всем клеткам с животными;
– в помещении устанавливается автоклав;
– сжигатель должен находиться в помещении и быть легкодоступным. Его можно заменить иным аналогичным прибором с согласия соответствующих служб;
– животные, инфицированные патогенными агентами группы риска 3, помещаются в клетки, изолированные от остального помещения, или в лаборатории перед вытяжными отверстиями вентиляции;
– подстилки для животных при использовании должны образовывать минимальное количество пыли;
– в помещении носится защитная одноразовая одежда. При выходе из помещения она снимается и автоклавируется перед уничтожением;
– следует обеспечить регулярную иммунизацию персонала.

Уровень биологической безопасности 4

Работа в данном помещении обычно тесно связана с работой в максимально изолированной лаборатории – группа риска 4. Поэтому правила, разрабатываемые национальными и местными органами здравоохранения, должны соответствовать обоим типам лабораторий. Применяются все правила работы с лабораторными животными, разработанные для уровней биологической безопасности 1, 2 и 3:
– доступ строго контролируется (наличие ключей), вход возможен лишь лицам, имеющим разрешение директора данного учреждения;
– персоналу не разрешается работать в одиночку: используется правило «работы вдвоем»;
– персонал должен иметь прекрасную подготовку по микробиологии и знать все факторы риска, сопряженные с работой, а также необходимые меры предосторожности;
– если рабочее помещение не является частью максимально изолированной лаборатории – с обозначением «*уровень биологической безопасности*», то оно должно быть расположено в отдельном здании;
– вход в помещение осуществляется через воздушный бокс, перед входом в который с «чистой» стороны располагаются раздевалки и душевые;
– помещение вентилируется через ВД-фильтры вытяжной вентиляцией, обеспечивающей отрицательное давление;
– при проектировании вентиляционной системы должна быть ликвидирована случайная возможность обратного тока воздуха, а также создания в помещении положительного давления;

– в комнате рядом с лабораторным помещением должен находиться автоклав с двумя дверцами;
– при входе в лабораторию персонал обязан снять уличную одежду и надеть защитную одежду одноразового использования. После окончания работы одежда снимается и помещается в специальные емкости для автоклавирования и уничтожения; персонал обязан принять душ;
– для поступления материалов используется воздушный бокс;
– все манипуляции с животными производятся в боксах 3 класса биологической безопасности;
– все животные должны находиться в изоляторах;
– перед удалением из лаборатории все отходы и подстилки для животных автоклавируются;
– иммунизация персонала и медицинский контроль осуществляются в соответствии с указаниями и международными правилами.

Идентификация опасных факторов и оценка риска

Определение опасных факторов

Определение возможной опасности воздействия вредных производственных факторов оценивается в соответствии со следующими нормативными документами (Государственными Стандартами и Санитарными правилами и нормами):
– ГОСТ 12.0.003–74 ССБТ «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация»
– ГОСТ 12.1.005–88 ССБТ «Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования»
– ГОСТ 12.1.007–76 ССБТ «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности»
– ГОСТ 12.1.008–76 ССБТ «Биологическая опасность. Общие требования»
– СанПиН 2.2.4.548-96 «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений»
– СанПиН 1.2.731-99 «Безопасность работы с микроорганизмами III и IV групп патогенности и гельминтами»
– СанПиН 2.1.7.1322-2003 «Гигиенические требования к размещению и обезвреживанию отходов производства и потребления»
– Руководство Р 2.2.755-99 «Гигиенические критерии оценки и классификация условий труда по показателям вредности и опасности

факторов производственной среды, тяжести и напряженности трудового процесса».

Кроме того, используются обновляемые перечни химически опасных веществ. Опасность известного химического вещества определяется также из MSDS на это вещество. Новое вещество или препарат считаются опасными, и при работе с ним соблюдаются все меры безопасности если:

– вещество относится к известному классу опасных веществ;
– если воздействие вещества на организм человека не было изучено;
– если структура вещества сходна со структурой заведомо опасного вещества.

Биобезопасность при работе с лабораторными животными

Содержание лабораторных животных в питомниках и ЭБК создает потенциальную возможность взаимного инфицирования человека и животных (антропозоонозы), а также перекрестного инфицирования животных, во избежание чего необходимо строгое соблюдение правил личной гигиены работников (Таблица 34).

Таблица 34

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОПАСНОСТИ АНТРОПОЗООНОЗОВ И ГРУППОВЫЕ НОМЕРА (ГН) УРОВНЯ ОПАСНОСТИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА В КЛАССИФИКАЦИИ КОНСУЛЬТАТИВНОГО КОМИТЕТА ВОЗ ПО ОПАСНЫМ ПАТОГЕНАМ (2002)

Виды патогенов	Возбудители и их «хозяева»-животные	Групповые номера
Кролики, крысы, хомячки, мыши и другие грызуны		
Бактерии	Salmonella (например, S.Typhimurium)	2
	Yersinia pseudo-tuberculosis	2
	Actinobacillus moniliformis (крысиная лихорадка)	2
Лептоспиры	Leptospira (различные виды)	2
	Lymphocytic choriomeningitis	3
Вирусы	Sendai (вирус)	2
	Hantaan (вирус)	3
Грибы	Trichphyton	2
	Micosporon	2
Паразиты, гельминты	Hymenolepis nana (The dwart tapeworm)	2
Птицы и другие летающие виды		
Бактерии	Salmonella	2
Вирусы	Вирус болезни Newcastle	2
	Пситтакозы и орнитозы	3
Грибы	Aspergillus	2
	Candida	2
Собаки, кошки и другие хищники		
Бактерии	Salmonella	2
	Pasteurella	2
	Возбудитель кошачьей лихорадки Cat-scratch fever agent	Не классифицирован
Лептоспиры	Leptospira иктерогеморрагическая	2
Вирусы	Кроличьи вирусы (специфические)	3
Грибы	Microsporum	2
Паразиты и гельминты	Toxoplasma Гонди	3
	Toxocara (собачья)	2
	Ancylostoma	2
	Echinicoccus granulosus	3
	Sarcoptes scabiei	Не классифицирован
	Ctenocephalides (собачья)	Не классифицирован
	Ctenocephalides (кошачья)	Не классифицирован
Мини-свиньи, овцы и иные крупные животные		
Бактерии	Bacillus anthracis (сибирская язва)	3
	Brucella species	3
	Mycobacterium tuberculosis	3
	Staphylococci	2
	Clostridia	2
	Erysipelothrix	2
Вирусы	Q fever (Coxiella burnetti)	2
	Cow Pox (чума коров)	2
Паразиты и гельминты	Entamoeba histolytica	2
	Giardia	2
	Balantidium coli	2

При медицинском обследовании до приема на работу рекомендуется проводить тесты на аллергические реакции. Также необходимо проверять кандидата на носительство некоторого вида бактерий. Лицо, в организме которого эти бактерии присутствуют, не должен работать с животными, поскольку может передать им эти бактерии. Необходимо также вести наблюдение за респираторными функциями, сделать флюорографию. Рекомендуется брать образцы сывороток, для того чтобы в случае возникновения зоонозов можно было провести анализы.

Сотрудники лаборатории должны представить личную и семейную историю болезни, касающуюся аллергий. Уже существующая аллергия на какой-либо вид животного, обычного для лаборатории, является явным противопоказанием. Нарушения опорно-двигательного аппарата, дыхательной системы и кровообращения также препятствуют утвержде-

нию кандидатуры, поскольку работа с животными предполагает высокую физическую нагрузку.

Сотрудники, работающие с лабораторными животными, должны *ежегодно* проходить медицинское обследование по правилам, действующим для пищевой промышленности, носители патогенной для животных флоры, включая антропозоонозы, как и больные люди, к работе с животными не допускаются.

Особое внимание необходимо обращать на симптомы аллергии и нарушения опорно-двигательного аппарата. Для подтверждения или исключения причин заболеваний могут потребоваться дополнительные лабораторные анализы. Респираторные функции сотрудников должны контролироваться независимо от их нарушений. *Продолжительность* нахождения в контакте с аллергеном до возникновения симптомов может быть *от полугода до двух лет*. Исследователи, находящиеся в долгом контакте с животным, предназначенным для опытов, могут проявлять *гиперчувствительность*. Поэтому ранний перевод животных в исследовательские лаборатории нежелателен. Профилактика заключается в использовании перчаток и масок при контакте с животными. Животные должны содержаться отдельно от рабочих мест сотрудников. У гиперчувствительных пациентов часто обнаруживали аллергические реакции на пыль, состоящую из эпителиальных клеток животных. Белки, содержащиеся в выделениях животных, таких как моча или слюна, также являются мощными антигенами. Исследования показали, что уровень содержания животного протеина в воздухе обратно зависим от степени вентиляции помещения. В связи с этим рекомендуется оснащение лаборатории локальной вентиляцией и ношение персоналом индивидуальных масок.

Исследователи и техники также находятся в контакте с потенциальными аллергенами, работая с животным или его тканями. Они должны соблюдать те же правила, что и основные сотрудники. Несмотря на следование правилам обращения с животными, последние *иногда кусаются*. В момент укуса в ткани человека заносятся не только антигены, но болезнетворные бактерии, чего следует не только остерегаться, но и опасаться.

Весь персонал, работающий с животными, должен пройти тренинги на случай возникновения ситуаций, угрожающих жизни и здоровью. В случае возникновения подобных ситуаций необходимо действовать согласно инструкции, утвержденной руководителем учреждения и находящейся в каждом подразделении. Также в каждом подразделении необходимо иметь и своевременно пополнять аптечку для оказания неотложной помощи.

Рекомендуется проводить раз в 3 года медицинское обследование персонала, сходное с проводимым при приеме на работу, включающее сдачу образцов сыворотки.

Персонал питомника и ЭБК должен быть обеспечен требуемым количеством спецодежды, санитарная одежда должна быть персонально маркирована (Таблицах 35—36). Ее количество на одного работника «чистой» зоны в питомниках и ЭБК барьерного типа должно позволять стирку не реже, чем через 1 день и ежедневное автоклавирование. Комплект спецодежды для персонала предбарьерной (конвенциональной) зоны имеет тот же набор одежды, но в количествах, обеспечивающих возможность стирки не реже двух раз в неделю. Необходим утвержденный обязательный перечень спецодежды для работников «чистой» и «грязной» зон.

Таблица 35

ПЕРЕЧЕНЬ СПЕЦОДЕЖДЫ ДЛЯ ПЕРСОНАЛА В ЗДАНИЯХ БАРЬЕРНОГО ТИПА

№№ п/п	Наименование предметов	Количество на 1 чел. в «чистой» зоне	Количество на 1 чел. в «грязной» зоне
1.	Санитарные брюки	6 пар	4 пары
2.	Санитарные халаты	6 пар	4 шт.
3.	Колпаки	6 шт.	4 шт.
4.	Маски	6 шт.	4 шт.
5.	Носки	6 пар	4 пары
6.	Трусы	6 пар	4 пары
7.	Нижняя рубашка (майка)	6 шт.	4 шт.
8.	Полотенца	6 шт.	4 шт.
9.	Тапочки	4 пары	2 пары

Таблица 36

ПЕРЕЧЕНЬ СПЕЦОДЕЖДЫ ДЛЯ ПЕРСОНАЛА ПРИ КОНВЕНЦИОНАЛЬНОМ СОДЕРЖАНИИ ЖИВОТНЫХ

№№ п/п	Наименование предметов	Количество на одного человека в «чистой» зоне	Количество на одного человека в «грязной» зоне
1.	Санитарные брюки	4 пары	4 пары
2.	Санитарные халаты	4 шт.	4 шт.
3.	Колпаки	4 шт.	4 шт.
4.	Полотенца	2 шт.	2 шт.
5.	Тапочки	2 пары	2 пары

Санитарная одежда подлежит стирке 1 раз в 3 дня. При содержании улучшенных конвенциональных животных одежда подвергается автоклавированию.

Резиновые перчатки (хирургические и бытовые) и бахилы должны быть одноразовые и закупаться в достаточном количестве. Работники дезинфекционно-моечного отделения должны обеспечиваться резиновыми сапогами и прорезиненными фартуками. Руководители и другие сотрудники, не имеющие доступа в «чистую» зону, пользуются санитарными халатами, легкой обувью и пластиковыми бахилами.

Вход персонала в «чистую» зону помещения барьерного типа производится через санпропускник, работник снимает одежду, кольца, цепочки, серьги и др. и оставляет их в шкафу «грязной» раздевалки санпропускника, тщательно принимает душ, используя мыло, мочалку, банную щетку, вытирается досуха полотенцем и одевается в полный комплект стерильной одежды. Очки протираются дезраствором. *В течение рабочего дня работник из «чистой» зоны не выходит*. В случае экстренного выхода процедура входа в «чистую» зону через санпропускник полностью повторяется заново. Таким же образом входят в «чистую» зону сотрудники, выполняющие эксперимент на животных, и при необходимости – технические работники. Рабочий инструмент подвергается автоклавированию или дезинфекции и проводится через шлюзы.

Персонал обеспечивается в необходимых количествах мылом и кремом для ухода за кожей. В помещениях с животными питомника и ЭБК необходимо иметь емкости с дезинфицирующими растворами для обработки рук (Таблица 37).

Таблица 37

СОДЕРЖИМОЕ КОМПЛЕКТОВ ПЕРВОЙ ПОМОЩИ

Предметы	Количество сотрудников		
	1–5	6–10	11–50
Руководство по биобезопасности (инструкция)	1	1	1
Индивидуально упакованный стерильный лейкопластырь	10	20	40
Стерильная повязка на глаза	1	2	4
Треугольная повязка	1	2	4
Стерильная повязка для наложения на обширные раны	1	2	4
Безопасные булавки	6	6	12
Стерильная лекарственно не обработанная повязка среднего размера	3	6	8
Стерильная лекарственно не обработанная повязка большого размера	1	2	4
Стерильная лекарственно не обработанная повязка очень большого размера	1	2	4
Перекись водорода (фл.)	1	1	1
Р-р бриллиантового зеленого (фл.)	1	1	1
Нитроглицерин (уп.)	1	2	2
Альбуцид (тюбик-капельница)	1	2	4
Спирт нашатырный (фл.)	1	1	1
Жгут (шт.)	1	2	3
Вата медицинская стерильная (уп.)	1	1	1
Перчатки медицинские (пар)	2	4	8
Ножницы	1	1	1
Лейкопластырь рулонный (шт.)	1	2	3
Лейкопластырь бактерицидный (шт.)	10	20	30
Устройство для проведения искусственного дыхания «Рот-Устройство-Рот» (шт.)	1	1	1
Салфетки марлевые медицинские стерильные (уп.)	1	1	
Бинт марлевый медицинский стерильный 7м х 14 см	1	2	3
Бинт марлевый медицинский нестерильный 7м х 14 см	1	2	3

Антропозоонозы

ВОЗ зарегистрировала до 200 зоонозов, то есть заболеваний, прямо или косвенно передающихся от животных человеку. При прямой передаче для возникновения зоонозов необходим только контакт. *Циклозоонозы* вызваны микроорганизмами, для размножения которых необходимы 2 вида позвоночных существ. Возбудители *метазоонозов* развиваются в беспозвоночных организмах, например в насекомых. *Сапрозоонозы* могут сохраняться в минеральной почве в течение долгого времени. Наиболее часто встречающиеся зоонозы: туберкулез, бруцеллез, оспа, псевдотуберкулез, сальмонеллез, рожа, пастереллез, листереллез, бешенство, орнитоз, пситтакоз, трихофития, токсоплазмоз, эхинококкоз, тениоз, туляремия и ботулизм. Многие из них вызывают у человека тяжелые заболевания.

Ответственность персонала

Работа с лабораторными животными требует соблюдения норм биобезопасности, так как существует опасность инфицирования человека болезнетворными бактериями и микроорганизмами. Человек может являться носителем микробов, способных передаваться животным.

На сотрудников возлагаются определенные обязанности по охране труда и технике безопасности, определяемые Правилами внутреннего трудового распорядка, с которыми сотрудники знакомятся при поступлении на работу. Сотрудник должен ознакомиться с инструкциями по охране труда и технике безопасности, стандартными операционными процедурами (СОП), выполнять правила безопасности и информировать руководителя и службу охраны труда о возникновении аварийной ситуации и случаях производственного травматизма, а также о несоблюдении правил техники безопасности другими сотрудниками.

В обязанность руководителя лаборатории входит обеспечение информированности персонала по всем вопросам безопасности, поддержание связи со службой охраны труда и техники безопасности, принятие мер к выполнению рекомендаций данной службы.

Глава 9

Основные принципы проведения экспериментов

Проведение экспериментов на лабораторных животных должно соответствовать общемировым принципам гуманного обращения с животными, тщательно планироваться, результаты эксперимента должны тщательно фиксироваться и храниться.

Планирование эксперимента

Выбор животных. Исследователь должен быть уверен, что выбранные животные наилучшим образом соответствуют целям эксперимента. Необходимо учитывать генетические характеристики, отсутствие болезней, факторы содержания и кормления, а также другие факторы, способные оказать влияние на результаты эксперимента. После выбора биологического вида необходимо убедиться, что животных достаточно для проведения эксперимента. При проведении эксперимента животные не должны испытывать боли и страданий, поэтому после отбора соответствующих видов и экземпляров животных для эксперимента необходимо обратить внимание на все аспекты, включая поведенческие характеристики животных.

Стандартные операционные процедуры (СОП). Все действия и манипуляции как рутинные, так и в рамках проведения исследования должны производиться в соответствии со стандартными операционными процедурами организации (СОП). СОПы организации должны разрабатываться, храниться, распространяться и обновляться надлежащим образом в соответствии с принятыми стандартами организации.

Необходимый перечень СОПов при проведении доклинического исследования должен включать следующие позиции.

- ✓ *Животные*: транспортировка, прием, идентификация, рандомизация, маркировка, обращение, взятие проб, наблюдение, эфтаназия, обращение с мертвыми животными.
- ✓ *Приборы*: эксплуатация, техобслуживание, калибровка, очистка, допуск в эксплуатацию.
- ✓ *Реактивы*: приготовление, маркировка, хранение, учет.
- ✓ *Записи*: сбор данных, обработка данных, подготовка отчетов, архивирование.
- ✓ *Тест-система*: подготовка помещений, условия окружающей среды, прием, передача материалов, размещение, установление характеристик, идентификация, уход, наблюдение, уничтожение.
- ✓ *Образцы*: сбор, идентификация, обращение, вскрытие, гистопатология.
- ✓ *Лабораторные испытания*: методы, валидация.
- ✓ *Управление и организация*: система документооборота, обучение персонала, аудит и инспекции, архивирование.
- ✓ *Компьютерные системы*: проверка, эксплуатация, безопасность, резервирование, валидация.

Мониторинг. Ежедневно необходимо осуществлять наблюдение за здоровьем и поведением животных. Должны соблюдаться правила биобезопасности при работе с животными.

Записи. Исследователь должен ежедневно вести дневник экспериментальной работы, включающий детальное описание рутинных ежедневных процедур, условий окружающей среды и других факторов, не относящихся к эксперименту, но которые могут влиять на результаты. Записи должны обеспечить возможность статистической обработки результатов эксперимента.

Консультации. При необходимости должны проводиться консультации с участием других научных сотрудников, ветеринаров, специалистов по лабораторным или диким животным. Участие ветврача необходимо в следующих случаях:

- – использование транквилизаторов, анальгетиков и анестезии;
- – премедикация, хирургия и послехирургическая помощь;
- – использование паралитиков с анальгезией;
- – длительное использование транквилизаторов, анальгетиков и анестезии.

Контрольный лист. После завершения планирования эксперимента исследователь должен перепроверить протокол для адекватного отражения следующих вопросов.

- – Отвечает ли проект этическим и научным принципам?
- – Могут ли быть достигнуты поставленные цели без использования животных?

– Есть ли какие-либо еще эксперименты, которые могут быть проведены параллельно для снижения количества используемых животных?
– Все ли средства и компетентный персонал имеются в наличии?
– Весь ли персонал оповещен о проведении эксперимента?
– Отобраны ли наиболее подходящие виды животных?
– Является ли подходящим биологический статус животных (генетический, микробиологический статус, способ кормления, общее состояние здоровья) для данного эксперимента?
– Подходят ли внешние условия (включая тип клеток, шум, освещение, температуру, влажность, вентиляцию, плотность содержания и социальную структуру)?
– Будут ли получены статистически достоверные результаты с минимальным количеством используемых животных?
– Если эксперимент связан с болью и дистрессом, то могут ли они быть минимизированы?
– Весь ли персонал обладает необходимой квалификацией для проведения манипуляций?
– Участвуют ли в эксперименте студенты и проинструктированы ли они?
– Какие мероприятия должны быть проведены для мониторирования состояния животных и их реакциям на манипуляции?
– Если подобные эксперименты уже проводились, то зачем проводить данный эксперимент?
– Если животные используются повторно, то как минимизировать кумулятивный эффект?
– Могут ли быть использованы какие-либо другие методы без животных для получения аналогичных результатов?

Средства диагностики

Клиническая лаборатория. Исследования по клинической биохимии и гематологии проводятся согласно протоколу конкретного исследования и не используются для диагностики заболеваний в программе мониторинга здоровья.

Некропсия и гистопатология. Патоморфологические исследования проводятся для диагностики патологических изменений органов и тканей животных, находившихся в конкретных исследованиях, где они запланированы в протоколе. При выявлении патоморфологических изменений органов контрольных животных исследователь сообщает результаты исследований ветеринарному врачу лаборатории.

Мониторинг здоровья животных проводится следующими методами:
– серологические исследования на антитела к вирусам – методами ELISA и IFA;
– микробиология взятых тканей при вскрытии животных – методами ПЦР и рутинными культуральными исследованиями;
– паразитология – микроскопическое исследование на наличие экзо- и эндопаразитов, патоморфологические исследования.

Проведение эксперимента

Ограничение боли и страданий. Боль и дистресс у животных не могут быть оценены теми же методами, что у человека. Поэтому решение о самочувствии животных принимаются исследователем исходя из предположения об их отсутствии. Необходимо предпринимать следующие меры:
– использование наиболее подходящих и гуманных методов;
– использование всех технических навыков и компетентного персонала;
– использование анальгезии;
– адекватное мониторирование появления боли и дистресса;
– составление четкого плана для устранения нежелательных последствий от манипуляций;
– использование незамедлительных мер для предотвращения боли и дистресса;
– использование анестезии, анальгезии и транквилизаторов, подходящих для выбранного вида животных и целей эксперимента;
– разработка плана эксперимента, снижающего боль и дистресс;
– проведение эксперимента в наиболее сжатые сроки;
– использование подходящих методов эвтаназии.

Использование общей или местной анестезии, анальгезии или транквилизаторов должно соответствовать виду животных, а также критериям, принятым в медицине, ветеринарии или практике лабораторного животноводства.

Эксперименты, результаты которых могут быть искажены, могут быть проведены без анестезии. Дистресса в ряде случаев можно избежать без медикаментозного вмешательства. Например, за счет хорошей адаптации животных к внешним условиям до момента начала эксперимента.

Мониторинг животных во время и после эксперимента должен быть постоянным и адекватным боли и дистрессу. Если боль или дистресс во время эксперимента становятся нестерпимыми, то необходимо немедленно оказать необходимую помощь. Если исследователь не может оказать помощь самостоятельно, то необходимо немедленно вызвать ветврача.

Если в процессе эксперимента произошла незапланированная гибель животного, об этом необходимо оповестить ветврача и отразить это событие в протоколе эксперимента.

Исследователь должен знать, каким образом животное, участвующее в эксперименте, сигнализирует о боли и дистрессе. Любые изменения в сне, кормлении, поении, почесывании, поведении должны быть описаны, оценены и учтены в будущем.

Мониторинг состояния животного. Необходимо постоянно наблюдать, не появилась ли острая боль или дистресс у животных. Это может выражаться следующим образом:

– агрессивное и/или ненормальное поведение (некоторое виды становятся слишком тихими);
– ненормальная стойка или движение;
– ненормальные звуки;
– изменение сердечно-сосудистой и/или респираторной функций;
– ненормальный аппетит;
– быстрое снижение веса;
– снижение температуры тела;
– рвота; ненормальная дефекация или мочеиспускание.

Подтверждением наличия боли и дистресса могут быть:

– потеря веса или отсутствие привеса;
– отсутствие нормального почесывания;
– отсутствие спокойного поведения;
– снижение репродуктивных функций;
– снижение устойчивости к болезням.

Пример листа наблюдений за животным приведен ниже.

Точки окончания эксперимента должны быть определены исследователем заранее. Смерть не должна изначально планироваться как точка окончания эксперимента. В качестве точек окончания эксперимента обычно принимают:

– если потери веса от первоначального превышают 20%;
– если произошла потеря в весе более чем 10% за 24 часа;
– если рост опухоли более чем на 10% превышает вес животного;
– если развился абсцесс;
– если температуры тела резко упала;
– если животное само себя покалечило;
– если животное не способно самостоятельно есть или вести нормальный образ жизни.

Все животные, отвечающие таким требованиям, должны быть подвергнуты эвтаназии для избавления от боли и страданий.

ЛИСТ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА ПОВЕДЕНИЕМ ЖИВОТНЫХ

Вид животного _______ Дата наблюдения эксперимента ______
Начальный вес _______ Исследователь __________________
Объем бутылочки для воды

Дата						
День недели						
Время						
ВИЗУАЛЬНОЕ НАБЛЮДЕНИЕ						
Активность						
Сутулая поза						
Нахохливание						
Частота дыхания						
Описание дыхания*						
ИЗМЕРЕНИЕ						
Вес животного, г						
% изменения веса тела						
Исследовательская активность						
Диарея						
Дегидратация						
Издаваемые звуки						
Захваты и конвульсии						
ЕДА И ПИТЬЕ						
Поедание корма**						
Количество воды в полной бутылочке						
Количество воды в бутылочке на дату наблюдения						
Раны**						
Кровотечения						
Другие нарушения***						
Швы, рубцы						
СОДЕРЖАНИЕ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТА						
Обезболивающие препараты						
Доза						
Дополнительные разрезы, жидкость, мл						
ПОДПИСЬ ПЕРСОНАЛА						

* – Описание дыхания: Б – быстрое, М – медленное, З – затрудненное, Н – нормальное.
** – Поставьте ОК, если все нормально.
*** – Другие нарушения: В – видимое улучшение, Г – гной.

Повторное использование животных в эксперименте. Обычно животных используют только в одном эксперименте. Однако в некоторых случаях можно повторно использовать животных, чтобы снизить общее количество животных в проекте и оградить от боли и страданий других животных. В этих случаях животных используют в процедурах, не связанных с болью и страданиями, или процедурах с небольшим биологическим стрессом, например изучение корма со взятием крови или неинвазивных процедурах. От одного эксперимента до следующего должно пройти достаточное количество времени для восстановления животного.

Длительность эксперимента ограничена целью исследования и должна быть максимально краткой, если связана с болью и страданиями животных.

Фиксация животных

Обездвиживание животных представляет собой комплекс мер физического или фармакологического воздействия, направленный на сдерживание естественной подвижности животного в целях проведения необходимых действий по уходу, обследованию или проведению экспериментальных действий, включая анестезию. Правильное обращение и обездвиживание могут дать животному ощущение безопасности и таким образом уменьшить его боль и испуг. Это не только позволяет в некоторых случаях провести эксперимент без анестезии, но и удовлетворяет принципу гуманного обращения с животными. Правильное обращение с животными обеспечивает также безопасность персонала и исследователей, поскольку успокаивает животное.

Персонал должен быть обучен правильному обращению с животными, поскольку физический контакт с ними является частью их ежедневной работы по уходу за животными и их размножению. Исследователи также должны иметь опыт обращения с животными, так как именно они проводят большинство экспериментов. В противном случае желательно, чтобы обученный сотрудник ассистировал исследователю при проведении эксперимента.

Для того чтобы не испугать животное, не причинить ему вреда или боли, движения при обращении с ним должны быть осторожными и мягкими. Во многих случаях целесообразно использовать сети и другие специальные приспособления для поимки и обездвиживания животного.

***Фиксация животных*.** В исследованиях на животных возникает вопрос надежной фиксации отдельных частей их тела или всего животного в целом. Без фиксации у собак или других крупных лабораторных животных трудно или невозможно проводить длительные внутривенные введения. Для иммобилизации животных их прикрепляют к столу или специальному устройству в положении на спине. В таком положении трудно проводить манипуляции на животном. Пребывание животных в таком неестественном положении является стрессорным фактором. Процесс фиксации животного в положении *на спине является трудным и вызывает агрессивную реакцию у животных.*

Существуют установки для фиксации крупных лабораторных животных, которые позволяют сохранить естественное положение животных, обеспечить надежную иммобилизацию тела всего животного или отдельных конечностей, на которых предполагается определенная манипуляция. Принцип этой установки заключается в том, что и лоток и все стойки для конечностей и для морды легко трансформируются. Детали такой установки можно легко подгонять под любые размеры животных по длине и высоте. В задней части устройства должно быть установлено пластиковое ассенизационно-санитарное устройство. В настоящее время различные фирмы выпускают такие установки.

Игрушечная собака размером с настоящую является хорошей моделью для тренировок. На моделях отрабатывают навыки. Животные же столь неоднозначны по своему поведению, что их во всех случаях и до начала иммобилизационных мероприятий необходимо предварительно приучить к пребыванию в станке. Этому способствует кормление после того, как животное постоит привязанным в станке. После двух-трех таких тренировок животных удается легко фиксировать и проводить необходимые процедуры без помощи посторонних лиц. Для полного обездвижения собаки прибегают к рауш-ингаляционному, так и неингаляционному наркозу животных.

Позвоночник кролика и других животных очень хрупок. Прыгая и борясь с исследователем, кролик может сломать себе спину. Некоторые кролики весьма агрессивны. Поэтому лучше приобретать навыки на моделях-игрушках. Недорогие модели кроликов, крыс и мышей состоят из оболочек, набитых хлопком. Открывающийся рот служит для развития оральных манипуляций. По размеру модели должны соответствовать реальным животным, а материал похож на их кожу. Стоимость модели столь мала, что нетрудно иметь 50 и больше моделей для большого класса. На модели показывают, как правильно вынимать их из клетки, удерживать при проведении манипуляций.

При соблюдении правил реальная мышь будет вести себя спокойно. При неправильных действиях мышь, а особенно крыса, будут вертеться, пытаться вырваться и укусить исследователя. Преподаватель приучает обучаемых бережно относиться к модели, делать все правильно. Другой метод, который может быть отработан на модели, — это введение зонда.

Могут быть использованы металлические и резиновые зонды. Процедура может быть продемонстрирована до работы с живым объектом. Для введения жидкостей в вену реальных мышей, хомяков и крыс можно применять специальные методы фиксации.

Мелких грызунов для длительного обездвиживания следует укутать в салфетку или привязать к операционному столу, стараясь не причинять им боль. При необходимости вызвать длительную иммобилизацию, прибегают к наркозу.

Наркоз и обезболивание

Всякое болевое раздражение вызывает у живого организма глубокую перестройку многих функций, в первую очередь центральной нервной системы, сердечно-сосудистой, эндокринной и других систем, а это приводит к искажению полученных результатов.

Эксперименты, проводящиеся хирургическими методами, должны проводиться только после обезболивания, причем до иммобилизации животного.

Расчет обезболивающего лекарственного средства проводится на килограмм или грамм массы тела лабораторного животного. И вводимое вещество, и время действия обезболивающего средства обязательно фиксируются в протокол эксперимента или в наркозную карту. Если острый опыт заканчивается смертью животного, его умерщвляют до окончания действия обезболивающего вещества.

Наркоз у животных проводят различными фармакологическими средствами и различными путями (ингаляционный, интратрахеальный, внутривенный, внутримышечный, ректальный). Чаще всего пользуются комбинированным наркозом.

Комбинированный наркоз является наиболее распространенным и общепринятым видом обездвиживания, выключения сознания и обезболивания у лабораторных животных. Этот вид наркоза является наиболее оптимизированным подходом в клинической анестезиологии, что, в свою очередь, делает его приемлемым в необходимых случаях биомоделирования лабораторных животных.

Так, например, при комбинированном наркозе у средних и мелких животных лучше начинать с этилового эфира. Внимательно следят за дыханием и тонусом животного, так как в этих условиях легко передозировать наркотик. В состоянии наркоза фиксируют животных к операционному столу и в дальнейшем, по мере необходимости дают наркоз, который следует проводить с осторожностью, поскольку барбитураты потенцируют эффекты морфина в отношении дыхательного центра. Лучше применять этаминал натрия (нембутал) внутрибрюшинно или подкожно в виде 5%-го раствора по 40—60 мг/кг. Наркоз наступает через 10—15 мин. после введения.

Для проведения недолгих операций (5—10 мин.) на мелких лабораторных животных (мыши, крысы) используют специальные ингаляционные анестезиологические камеры. Для крупных животных целесообразно использовать инъекционный наркоз.

Исследователи должны безусловно соблюдать все требования законов и директивных документов, регламентирующих оборот наркотических и психотропных средств, а животные-модели не должны при этом испытывать боли, дистресса и страдания.

Следует особо подчеркнуть, что перед дачей наркоза, а во многих случаях и перед началом эксперимента, абсолютно необходима премедикация или лекарственная подготовка.

Допустимые методы *эвтаназии* или умерщвления экспериментальных животных применяются только в тех случаях, когда они после проведенного эксперимента остаются нежизнеспособными или испытывающими физические страдания, которые невозможно устранить, а также в случаях, когда эксперимент в соответствии с программой должен завершатся умерщвлением его. Смерть должна быть быстрой, без эмоционального стресса, боли и страданий, с потерей сознания, надежной и необратимой. При доставке животного к месту умерщвления оно не должно подвергаться травме.

Идеальный метод эвтаназии должен включать такие условия, как: отсутствие боли; быстрое отключение сознания; быстрая смерть; минимально ограничивающее движение; минимальное возбуждение, подходящие по возрасту, виду и состоянию здоровья, оказывающий минимум страха и психологического стресса, а также надежность, необратимость, простоту для наблюдения, безопасность для оператора, эстетически допустимые.

Допустимые методы эвтаназии животных

Существует несколько методов эвтаназии экспериментальных животных — это *физические и химические.* Физические методы включают оглушение, декапитацию и перелом шейных позвонков. Химические методы включают ингаляционные средства (такие как CO, CO_2), летучие обезболивающие средства (галотан, энфлуран и др.) и снотворные (барбитураты и ряд др.).

Самый оптимальный метод умерщвления животного — это передозировка наркоза. В острых случаях животное умерщвляется до оконча-

ния действия наркоза. В тех случаях, когда умерщвление осуществляется углекислым газом CO_2, следует помнить, что его высокая концентрация может вызвать стресс у экспериментальных животных, и использовать необходимо только сжатый CO_2. Наименее эффективен CO_2 для крыс и мышей по сравнению с *галотаном* для крыс и *энфлураном* для мышей. Ряд авторов считают, что CO_2 должен применяться при эвтаназии или анестезии мелких грызунов только в сочетании с галотаном. Оба газа (СО и CO_2) перед бессознательным состоянием вызывают легочное кровотечение. Кроме того, CO_2 при концентрациях больше чем 50% может вызвать припадки, носовые кровотечения, вставание на лапки, дефекацию, сильное слюнотечение. С большой осторожностью необходимо подбирать метод эвтаназии для новорожденных лабораторных животных.

Оценка гуманности метода эвтаназии всегда сложная, она должна включать обязательно ЭЭГ, на которой определяются спонтанные или вызванные потенциалы и распознаются поведенческие реакции животного.

Поведенческие сигналы распознаются по следующим показателям: звуки голоса; мочеиспускание/дефекация; потливость; борьба; защитная или переадресованная агрессия; расширение зрачков; тахикардия; слюнотечение.

При декапитации грызунов измерение уровня *кортикостерона* более полезно при оценке потенциального стресса, но ЭЭГ является наиболее общим средством для оценки гуманности декапитации. Не менее важно учитывать и сторонних наблюдателей при оценки гуманности метода эвтаназии животных, которые подвергались некорректной эвтаназии или те, которые откликались медленнее или неправильным образом (абберантнее) на примененный метод. Например, в исследовании по изучению мозговых импульсов при декапитации крыс среднее время ЭЭГ составило 13–14 секунд, а у одного животного это время составило 29 секунд.

Эвтаназия *мышей* осуществляется углекислым газом в течение 10 мин., шейной дислокацией, фентобарбитоном, 5% раствором 0,5мл и/п. Умерщвление *мышей* производят также эфиром, хлороформом, пропусканием через головной мозг электрического тока.

Эвтаназия *крыс* осуществляется углекислым газом в течение 15–20 мин., шейной дислокацией, фентобарбитоном 5% раствор 0,5мл и/п, гильотиной. *Крыс* умерщвляют также хлороформом, эфиром, помещая их в небольшую закрытую посуду, или пропусканием электрического тока через головной и спинной мозг.

Эвтаназия *морских свинок* осуществляется углекислым газом, фентобарбитоном 90мг/кг и/п. *Морских свинок* умерщвляют также хлороформом, эфиром, вводя их ингаляционно, внутрибрюшинно и в толщу легких, а также пропусканием электрического тока от городской сети через головной и спинной мозг.

Эвтаназия *кроликов* осуществляется фентобарбитоном 100 мг/кг в/в или и/п. *Кроликов* можно умерщвлять нанесением удара по основанию черепа (при этом держат их за задние конечности вниз головой), внутривенным введением хлороформа, эфира или воздуха, а также пропусканием электрического тока из городской сети через спинной и головной мозг (один электрод в виде зажима Пеана накладывают на угол рта, другой в виде иглы вводят под кожу в области крестца). Время воздействия тока — 3–5 сек.

Эвтаназия крупных лабораторных животных (*мини-свиньи, собаки, кошки и др.)* осуществляется введением в толщу легких или кровь хлороформа (5–7 мл), эфира (15–20 мл) или пропусканием электрического тока из городской сети через центральную нервную систему (один электрод в виде иглы вводят в области поясничных позвонков, а другой в виде зажима Пеана накладывают на угол рта). Более приемлемые методы изложены в Таблице 38.

Таблица 38

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИЕМЛЕМЫХ МЕТОДОВ ЭВТАНАЗИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Виды животных	Скорость	Эффективность	Удобство	Риск	Гуманность	Оценка в баллах	Вещества и лекарственные препараты, физические методы выбора, дозы, формы и особенности применения для эвтаназии
I. ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ							
а) Препараты для инъекции							
1. Натрия пентобарбитонат (нембутал, nembutal)							
Грызуны	++	++	+	+	++	5	Обычно используется 18%-й р-р (200 мг/мл) препарата в дозе 200 мг/кг в/в или в/б; для крупных птиц в/б или внутричерепная инъекция (Foramen magnum), для грызунов в/в и в/б инъекции; для кроликов и крупных млекопитающих в/в
Кролики		++	+	+	++	5	
Плотоядные	++	++	-	+	++	5	
Птицы		++	+	+	++	5	
Крупные млекопитающие	++	++	-	+	++	5	
2. Препарат Т-61							
Грызуны	++	++	-	+	++	4	Т-61 является комбинацией местного анестетика, снотворного и курареподобного вещества. Средство предназначено только для медленного в/в введения, иначе оно вызывает боль у животных; птицам массой < 250 г можно вводить в грудную мышцу
Плотоядные		++	-	+	+	4	
Кролики	++	++	-	+	++	4	
Птицы		++	+	+	++	4	
Крупные млекопитающие	++	++	-	+	++	4	

3. Секобарбитал/дибукаин							
Плотоядные	++	++	-	+	++	4	Приемлемо в/в введение
4. Хиналбарбитон/нуперкаин							
Крупные млекопитающие	++	++	-	+	++	5	Приемлемо в/в введение лошадям
Б) Ингаляционные средства							
5. Двуокись углерода							
Грызуны	+	++	++	++	++	4	CO_2 в концентрации >70% приемлем для грызунов, кроликов и свиней; для морских свинок и для цыплят в возрасте 72 ч – 100% CO_2. CO_2 не следует использовать для животных, способных нырять
Птицы	++	++	++	++	+	4	
Кролики		+	++	++	+	1	
Крупные млекопитающие	+	+	++	++	+	1	
6. Окись углерода							
Грызуны	+	+	+	-	++	2	Опасен для оператора
Птицы	+	+	++	-	+	2	
Кролики	+	+	++	-	++	1	
7. Летучие анестетики – галлотан, энфлуран, изофлуран							
Грызуны	++	++	++	+	++	5	Приемлемы; смерть необходимо подтвердить; у кроликов возникают признаки дистресса; для рыб используется только галлотан; из крупных млекопитающих применяются у ягнят и козлят.
Плотоядные		++	+	+	++	4	
Птицы	++	++	++	+	++	4	
Кролики		++	++	+	-	2	
Крупные млекопитающие	++	+	+	+	+	2	
II. ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ							
8. Цервикальная дислокация							
Грызуны	++	++	+	++	-	4	Приемлем для грызунов массой < 150 г, для кроликов – < 1 кг. Для цыплят в возрасте 72 ч
Кролики		++	-	++	-	4	
Птицы	++	++	-	++	-	4	
9. Декапитация							
Грызуны	+	+	+	++	-	2	Можно использовать у грызунов и кроликов массой < 1 кг, но предпочтительнее другие методы
Кролики	+	+	+	++	-	2	
10. Сотрясение мозга (оглушение)							
Грызуны	++	++	+	++	-	4	Приемлем для грызунов массой < 1 кг; для птиц – < 250 г и для новорожденных плотоядных; для крупных млекопитающих необходимо немедленное обескровливание
Кролики		++	+	++	-	2	
Птицы	++	+	-	+	+	2	
Плотоядные							
Крупные млекопитающие	++						

11. Оглушение электротоком							
Крупные млекопитающие	++	++	+	-	+	3	Смерть следует подтвердить. Не следует применять у кошек, так как их шерсть отличается высокой электропроводностью, и у рогатых животных, если рога мешают наложению электродов.
Кролики		++	-	-	-	3	
Плотоядные	++						
Птицы	+	+	+	-	-	1	
12. Мацерация							
Птицы	++	++	++	++	-	4	Приемлем для цыплят в возрасте до 72 ч
13. Микроволновое облучение							
Грызуны	++	++	-	++	+	3	Применяется нейробиологами для фиксации метаболизма мозга; для мышей приемлемо облучение всего тела
Кролики		++	-	++	+	3	
Птицы	++	++	-	++	+	3	
14. Быстрое замораживание							
Грызуны	-	+	++	++	+	1	Приемлем, если это предусмотрено планом эксперимента. Приемлем для новорожденных грызунов и плодов кроликов с массой < 4 г
Кролики	+	+	++	++	+	1	
15. Привязной гарпун							
Крупные млекопитающие	++	++	++	+	+	5	Приемлем для крупных пресмыкающихся; гарпун не всегда эффективен для умерщвления крупных свиней и взрослых быков из-за толщины и плотности их черепа.
Кролики	++	++	-	+	+	4	
Плотоядные	++	++	-	++	++	3	
16. Отстрел							
Пресмыкающиеся	++	++	++	-	+	4	Приемлем только в полевых условиях; предпочтителен для лошадей.
Крупные млекопитающие	++	++	-	-	-	1	

Примечание: приемлемость метода оценивается следующими показателями:
– скорость действия агента: «++» – очень быстро, «+» – быстро «-» – медленно;
– эффективность метода: «++» – высокоэффективен, «+» – эффективен, «-» – неэффективен;
– удобство метода: «++» – прост в применении, «+» – требует опыта, «-» – требует специального обучения экспериментатора;
– риск для оператора: «++» – безопасен, «+» – опасность минимальная, «-» – опасно;
– гуманность: «++» – приемлем для всех экспертов, «+» – приемлем для большинства экспертов, «-» – неприемлем для всех экспертов и экспериментаторов.
– оценка в баллах «1–5»: 1 – не рекомендуемый метод, 5 – наиболее рекомендуемый метод.

Установление смерти. Оценка наступления смерти проводится по одному или нескольким факторам. Обязательно делают запись о смерти животного с указанием количественных факторов, ее установивших.

Имплантации

Исследователи должны быть готовы к дополнительным асептическим мероприятиям при имплантации инородных тел. Часто после проведения терапии антибиотиками усложняется удаление протеза. Иногда образуются фистулы. Поэтому послеоперационное наблюдение особенно важно.

Нейромускулярный паралич

Нейромускулярные блокирующие агенты должны использоваться в сочетании с адекватной общей анестезией. Иммобилизация животных не требуется. Необходим контроль частоты сердечных сокращений, давления крови, насыщенности крови кислородом, ширины зрачка, электроэнцефалограммы.

Электроиммобилизация

Электроиммобилизация не может быть альтернативой анальгезией или анестезией.

Валидность моделей болезней

Валидация животных-моделей для изучения болезней должна проводиться с точки зрения ее соответствия проявлениям патологических процессов у человека. Животное должно использоваться только в случае, если модель достаточно достоверна. Нельзя забывать о том, что животные будут испытывать те же боль и страдания, что и человек при соответствующей болезни. Целью и точкой окончания эксперимента, если это возможно, нельзя ставить гибель животного. Тесты на животных проводят только тогда, когда их нельзя выполнить другим способом. Эксперимент должен быть прекращен, как только выявляется токсичность, с минимальным ущербом для животного. Количество животных в эксперименте должно быть минимальным.

Изучение поведения животных и рисков

При изучении поведения животных надо избегать биологических стрессов, нельзя использовать лишение животных еды и питья, а также болевых стимулов. Стресс и боль относятся к категории рисков для здоровья и жизни животных. В качестве источника риска могут также изучаться: вирусы, бактерии, грибы, паразиты, радиация, радиоактивность, субстанции, вызывающие коррозию, токсины, аллергены, карциногены, рекомбинантные ДНК, газы для анестезии, физические повреждения.

Все эксперименты нужно проводить в соответствии с руководством и требованиями национальных Комитетов по охране животных, Министерства здравоохранения и другими видами законодательных актов. Протоколы экспериментов должны включать детальные описания рисков, а также мер предосторожности для исследователей, студентов и преподавателей. Инфицированные животные должны быть изолированы, чтобы избежать риска для заражения людей.

Эксперименты с генетическим материалом

Все эксперименты с генетическим материалом, зародышами или эмбрионами требуют дополнительного согласования и проводятся в соответствии с существующим законодательством по охране животных. Все манипуляции с генетическим материалом являются потенциально опасными для состояния здоровья животных, поэтому возможно проявление побочных эффектов, о которых необходимо ставить в известность IACUC. Существует достаточное количество линий животных с врожденной патологией, которые могут быть получены обычными процедурами по разведению. Прежде чем планировать эксперименты такого рода, надо быть абсолютно уверенным в их необходимости.

Эксперименты с опухолями

Эти эксперименты потенциально вызывают боль и страдания, поэтому перед планированием такого эксперимента необходимо изучить все альтернативные возможности его замены. При проведении эксперимента надо особенно тщательно осматривать животных, следить за возможной потерей веса. Эвтаназию надо проводить до того, как животное начало испытывать нестерпимые боль и страдания. Также необходимо следить за количеством асцитной жидкости, которая становится источником дистресса животного. Точкой окончания эксперимента не должна быть смерть животных.

Исследования центральной нервной системы

Анатомические или химические повреждения ЦНС широко применяют для изучения ее функционирования в здоровом и больном организме. Такие эксперименты требуют особых согласований, так как приводят к нарушениям двигательной активности, потере чувствительности, температуре, болям, потере аппетита и другим нарушениям. Для работы могут понадобиться специальные клетки и приспособления для постоянного мониторирования животного.

Содержание с ограниченным кормлением и поением

Эксперименты с ограничением кормления и поения или совсем без корма и воды не должны быть продолжительными. Необходимо следить за балансом жидкости и/или потерей веса животного, все показатели должны быть тщательно задокументированы.

Эксперименты на эмбрионах

Когда проводят эксперименты на эмбрионах или неонатальные хирургические вмешательства, они не должны сопровождаться болью и страданиями, эвтаназия должна применяться немедленно после рождения, чтобы избежать боли и дистресса.

Анальгезия и анестезия при экспериментах на эмбрионах должны быть применены, как ко взрослым животным. При хирургических вмешательствах в организм матери анестезия должна быть сделана и эмбрионам. Яйца должны быть разрушены до вылупливания птенцов, если только само вылупливание не является целью эксперимента.

Исследование механизмов и облегчения боли

В таких экспериментах должны быть тщательно подобраны меры уменьшения боли. Исследователь должен быть уверен, что:

- причиняемая боль находится на допустимом пределе;
- причиняемая боль является минимальной в соответствии с целями эксперимента;
- есть средства для облегчения боли, если это необходимо.

Исследования состояния здоровья животных

Когда изучают возможности улучшения здоровья животных, исследователи нуждаются в условиях, которые можно повторить, например, рана, травма, нарушения питания, болезнь, физические повреждения или стресс. В этих случаях боль и дистресс также можно повторить. В таких экспериментах исследователь должен быть уверен, что:

- цель эксперимента – забота о здоровье животного;
- альтернативные методы, например, уже травмированное животное, не могут быть использованы;
- предприняты все шаги для уменьшения боли и дистресса;
- эксперимент не приведет к дистрессу или гибели животного, как его окончания. Будут применены все средства для избавления животного от полученного увечья. Если это невозможно и эксперимент с неизбежностью приводит к гибели животных, то количество погибших животных должно быть минимально.

Боль, страдание, анальгезия и анестезия

IACUC определена 3-уровневая шкала боли.

Отсутствие боли (категория «С») – исследования, не сопровождающиеся причинением животным боли или страданий сверх того, что можно ожидать при сравнительно мягком и кратковременном воздействии типа инъекции, глубокой пальпации и т.п.

Облегчаемая боль (категория «D») – процедуры с использованием наркоза или обезболивания в целях облегчения боли и страданий. Примерами могут служить общий наркоз при операциях, а также применение анальгетиков или противовоспалительных средств.

Не облегчаемые боль или страдания (категория «Е») – процедуры, где в силу определенных веских причин облегчение боли и страданий служит противопоказанием, например вследствие риска искажения результатов в случае применения обезболивающего препарата.

Степень боли и страдания и соответствие процедур и манипуляций указанной категории оценивает ветеринарный врач.

Медикаменты, используемые для каждого из видов

Мыши – кетамина гидрохлорид, ксилазин, дроперидол, ацепромазин, бупренорфин, трамадол, ибупрофен, аспирин.

Крысы – кетамина гидрохлорид, ксилазин, ацепромазин, хлоралгидрат, бупренорфин, трамадол, ибупрофен, аспирин.

Контроль за использованием анестетиков и анальгетиков

Анестетики и наркотические анальгетики хранятся в специальной комнате, в которой эти препараты находятся в металлическом сейфе. Однодневный запас, необходимый для проведения текущих исследований, хранится в корпусе биомедицинских исследований в металлическом сейфе в специальной комнате с ограниченным доступом.

Работа с контролируемыми веществами осуществляется только лицами, имеющими специальный допуск. Допуск лиц на работу с контролируемыми веществами утверждается Государственным комитетом РФ по контролю за оборотом наркотических средств и психотропных веществ. Выдача контролируемых веществ осуществляется по требованию, подписанному руководителем лаборатории.

Выдача и контроль использования препаратов осуществляется провизором, который ведет соответствующую документацию по учету препаратов.

Подготовка и опыт персонала, осуществляющего анестезию и эвтаназию

Анестезия и эвтаназия проводятся персоналом, имеющим соответствующую квалификацию. Изучение техники эвтаназии входит в программу обучения персонала, работающего с животными.

Хранение и контроль медикаментов

Медикаменты должны храниться в специальном помещении с соответствующими записями в журналах учета.

Общий порядок хранения

Неконтролируемые вещества хранятся в зависимости от использования и от условий хранения – по рабочим зонам Лаборатории, на стеллажах, в шкафах и в холодильниках. Токсические вещества хранятся в закрытых металлических шкафах. Летучие вещества – в вытяжных шкафах.

Полученные для исследования вещества хранятся в провизорской комнате с ограниченным доступом с соблюдением правил хранения – в холодильнике, морозильнике или при комнатной температуре.

Однодневный запас контролируемых веществ также хранится в металлическом сейфе провизорской комнаты. Кроме этого, контролируемые вещества хранятся в металлическом сейфе в специально оборудованной охраняемой комнате.

Процедура ведения записей

Ведется журнал регистрации операций, связанных с оборотом наркотических средств и психотропных веществ, где указывается дата получения, количество упаковок, текущий расход с указанием исследования, исследователя, выданного количества, использованного количества, оставшегося количества. Журнал пронумеровывается, прошнуровывается, скрепляется печатью организации и подписью руководителя лаборатории.

Проверка медикаментов и материалов на срок годности

За контроль срока годности веществ отвечает исследователь, который использует эти вещества, а также провизоры, которые контролируют все манипуляции с веществами, поступающими на доклинические исследования безопасности. Годность вещества определяется по дате на упаковке, соблюдению условий хранения, данным в других документах на вещество (паспорт, инструкция использования, сертификате качества).

Глава 10

Стандартные операционные процедуры

Стандартная операционная процедура (СОП) – это документ, детально описывающий процедуры манипуляций, которые, как правило, подробно не описываются в протоколах конкретных исследований. Написание СОП осуществляется квалифицированными в данной области специалистами. СОП утверждается руководством исследовательской организации и подлежит строгому исполнению, так как формирует правильное и пошаговое представление о процедуре или манипуляции, что уменьшает вероятность допущения ошибок, тем самым гарантируя высокое качество работы. Все отклонения от СОП документируются как первичные данные, они подписываются руководителем исследования или ответственным исполнителем. Кроме того, рассматривается вопрос о влиянии этого отклонения от СОП на качество получаемых данных.

При написании СОП на первой странице обычно указывается следующая служебная информация.

- Название исследовательской организации.
- Название СОП.
- Порядковый номер СОП.
- Номер версии СОП.
- Номер страницы из общего количества страниц.
- Дата введения СОП.
- Ф.И.О. и должность автора СОП.
- Ф.И.О. и должность сотрудника, утвердившего СОП.
- Форма обучения СОП (чтение или практическое занятие).

На каждой последующей странице в верхнем колонтитуле указывается номер СОП, номер версии, дата введения СОП в действие и номер страницы. В содержательной части СОП приводится цель данного документа, а также персонал, которому он предназначен. Описание процедуры должно быть достаточно полно, но в то же время кратко, не перегру-

жая документ излишней информацией. При необходимости СОП может содержать данные о правилах техники безопасности при выполнении описанной процедуры, а также может включать в себя ссылки на другие СОП, книги, статьи, руководства и прочие источники.

В качестве приложений к СОП могут выступать различные бланки, которые будут использоваться для регистрации данных, полученных при выполнении процедуры. Бланк должен содержать (в виде колонтитула) следующую информацию: номер приложения, номер СОП, номер версии, дату введения СОП в действие.

СОП подлежит своевременному пересмотру. Очередной пересмотр обычно проводят один раз в 2 года. Если СОП утрачивает актуальность в связи с изменением методики или заменой оборудования, все копии документа изымаются из обращения, и оригинал передается в Архив. Содержание СОП может быть изменено, дополнено или сокращено до наступления периода пересмотра, если это необходимо для работы. В этом случае оформляется поправка к СОП. При пересмотре учитываются все имеющиеся поправки. После пересмотра СОП также утверждается руководством исследовательской организации. Оригиналы устаревших версий СОП сохраняются в Архиве.

Согласно международным принципам надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practices – GLP), разработанным организацией экономического сотрудничества и развития (Organization for Economic Cooperation and Development – OECD), исследовательская организация должна иметь Программу СОП, отражающую весь спектр проводимых работ. Программа СОП должна включать в себя, но не ограничиваться, описание следующих видов деятельности.

1. *Тестируемые и стандартные объекты исследования.*

Поступление, идентификация, маркировка, манипуляции при работе, отбор проб, хранение.

2. *Приборы, материалы и реактивы.*

а) *Приборы.* Использование, обслуживание, уход, калибровка.

б) *Компьютерные системы.* Валидация, порядок работы и обслуживания, порядок доступа к информации, контроль над внесением изменений, создание резервных копий.

в) *Вещества, реактивы и растворы.* Приготовление и маркировка.

3. *Текущие записи, отчетность, хранение и извлечение информации.*

Система обозначений, сбор данных, подготовка докладных (актов, донесений, служебных записок), методы индексации, обработка информации (в том числе компьютеризированная).

4. *Тест-системы.*



Рис. 2. Фиксация мыши для проведения операции изотрансплантации кожи



рис. 3. Фото гильотины




Рис. 4. Взятие крысы для переноса в другую клетку






Рис. 5. Фиксация крысы для выполнения манипуляций

а) подготовка помещений и создание условий для размещения тест-систем;
б) получение, транспортировка, размещение, характеристика и идентификация тест-систем, уход за ними;
в) подготовка тест-систем, наблюдения и осмотры до, во время и после исследования;
г) обращение с тест-системами, умирающими или умершими во время исследования животными;
д) сбор, идентификация и порядок работы с образцами, включая некропсию и патоморфологические исследования;
е) размещение тест-систем на исследовательских площадках.

5. *Программа обеспечения качества.*

Планирование и составление графика проверок, проведение проверок и отчетность по ним.

В исследовательской организации программа СОП по лабораторным животным может включать в себя несколько разделов. Первый раздел программы, например, может быть посвящен приемке, содержанию, уходу и контролю здоровья животных. Конкретные СОП могут иметь следующие названия.

- ✓ Основные принципы работы в комнате содержания животных.
- ✓ Рутинные манипуляции по уходу за грызунами.
- ✓ Карточки на клетках.
- ✓ Умершие животные.
- ✓ Ежедневный осмотр состояния животных.
- ✓ Доклад об обнаружении отклонений здоровья животных.
- ✓ Признаки нарушения здоровья животных.
- ✓ Лишение корма.
- ✓ Размещение лабораторных животных в клетках.
- ✓ Хранение и подготовка подстила.
- ✓ Хранение и подготовка корма.
- ✓ Прием животных, карантин, адаптация.
- ✓ Инвентаризация животных.
- ✓ Проход персонала в «чистую» зону содержания животных.
- ✓ Поступление материалов и оборудования в «чистую» зону.
- ✓ Правила содержания грызунов в барьерной зоне.
- ✓ Содержание грызунов в конвенциональных комнатах.
- ✓ Перемещение и вынос животных.
- ✓ Заказ животных.
- ✓ Беглые животные.
- ✓ Использование резервных животных.

- ✓ Санитарная обработка клеток и аксессуаров для содержания животных.
- ✓ Программа контроля здоровья животных.
- ✓ Санитарная обработка уборочного инвентаря.

В этих СОП содержится информация о том, как осуществляются транспортировка, прием, первоначальная оценка здоровья животных и карантин; как проводят ежедневное наблюдение за животными, оказывают ветеринарную медицинскую помощь, проводят лечение и изоляцию больных животных; как выполняют мониторинг состояния здоровья животных, который включает в себя серологические, бактериологические, паразитологические, патоморфологические и другие исследования; какие используются клетки и стеллажи; как контролируются условия окружающей среды в комнатах содержания животных; какие используются корма, подстил и вода; как происходит кормление и поение. Особое внимание уделяется вопросам, которые связаны с описанием работ с животными в выходные и праздничные дни, а также, что делать в случае обнаружения нарушений в здоровье животного или в случае его смерти. Кроме этого, в СОП описывается, как часто моются и подвергаются санитарной обработке клетки, какие дезинфицирующие и очищающие агенты для этого используются, как часто и с использованием каких дезинфектантов выполняется влажная уборка комнат содержания животных, как обрабатывается уборочный инвентарь, где хранятся отходы и как часто они удаляются из помещений.

Образец СОП «Рутинные манипуляции по уходу за грызунами»

СОП №:		Номер версии:		Начало действия:		стр. 146 из 297

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

РУТИННЫЕ МАНИПУЛЯЦИИ ПО УХОДУ ЗА ГРЫЗУНАМИ

Составлено:
разработчик Дата

Утверждено:
менеджмент Дата

Форма обучения: _√_ Чтение _____ Практические занятия

1. ЦЕЛЬ:

1.1. СОП описывает порядок выполнения рутинных процедур по уходу за грызунами. Выполнение этих процедур направлено на обеспечение правильного содержания животных с соблюдением принципов гуманности и в целом на обеспечение качества исследования.

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

2.1 СОП предназначена всем лаборантам, осуществляющим уход за животными, сотрудникам ветеринарной службы и исследователям, контролирующим состояние животных. Лаборанты ответственны за ежедневное выполнение рутинных процедур и заполнение соответствующей документации. Обо всех отклонениях в комнате содержания животных лаборант обязан сообщать руководителю исследования и ветеринарному врачу.

3. ВЫПОЛНЕНИЕ

3.1 Общие правила

1.1.1 Рутинные манипуляции включают в себя регулярные мероприятия по уходу и контролю состояния животных: ежедневный осмотр животных, кормление, поение, смену подстила, санитарную обработку помещений и инвентаря.

1.1.2 Рутинные манипуляции выполняются персоналом, прошедшим обучение и имеющим опыт работы с лабораторными животными.

1.1.3 Все действия и манипуляции персонала должны производиться должным образом, чтобы минимально физически воздействовать на животных: необходимо соблюдать тишину, не есть, не пить, не курить. При выполнении рутинных процедур стараться не пылить и не сорить. Двери комнат держать плотно закрытыми.

1.1.4 Все манипуляции должны проводиться с соблюдением принципов гуманного обращения с животными.

1.1.5 Чистый инвентарь для ухода за животными (клетки, подстил, аксессуары, бутылочки и др.) готовят заранее, и после прохождения через автоклавы хранят в специально отведенных местах.

СОП №:		Номер версии:		Начало действия:		стр. 147 из 297

1.1.6 Вся информация о выполненных рутинных манипуляциях заносится в рабочий лист «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных».

2.2 Порядок проведения рутинных мероприятий.

2.2.1 Животные в зонах содержания находятся при 12-часовом цикле освещения с автоматическим включением освещения в 08:00 и выключением 20:00. Процедуры по уходу выполняют утром, если протоколом исследования не предусмотрено иначе.

2.2.2 Перед началом работ в комнате обращают внимание, работает ли вентиляция (тяга воздуха из комнаты в коридор) и все нужные источники освещения (обо всех неполадках сообщают в техническую службу, делают запись в графе «Примечания» в листе «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных»).

2.2.3 Регистрируют параметры окружающей среды (температура, влажность).

2.2.4 Проводят влажную уборку полов, чтобы собрать скопившиеся пыль и мусор и избежать их разноса по комнате. Во время влажной уборки в комнате нельзя шуметь. Двигать инвентарь и перемещать клетки надо осторожно, чтобы не стрессировать животных, так как это может исказить картину состояния их здоровья.

2.2.5 Обязательно проводят осмотр состояния животных. Все обнаруженные отклонения в состоянии животных регистрируют в «Протоколе об отклонениях в здоровье животных». Умерших животных обязательно удаляют из клеток содержания, помещают в отдельные пакеты с идентификационными карточками/записками, заполняют «Протокол обнаружения трупа животного».

2.2.6 При проверке общего состояния животных проверяют потребление корма и питья по количеству корма в кормушке и уровню воды в бутылочке. По их количеству оценивают, в норме ли их потребление.

В форме «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных» отмечают время проверки потребления корма и питья. При необходимости проводят кормление, поение животных и смену подстила.

2.2.7 После завершения всех манипуляций проводят санитарную обработку комнаты. Санитарную обработку пола и стола проводят ежедневно. Полную санитарную обработку комнаты проводят еженедельно.

2.3 Кормление животных

2.3.1 Кормление животных осуществляют полнорационным гранулированным кормом для грызунов.

2.3.2 Кормление грызунов может осуществляться ad libitum (неограниченно), или в соответствии с суточными нормами кормления, или по специальной диете в соответствии с Протоколом исследования.

2.3.3 Кормление животных в исследовании проводят в соответствии с Протоколом исследования. Корм должен быть одинаковым на протяжении всего исследования, если Протоколом исследования не предусмотрено иное.

Персонал, осуществляющий уход за животными, должен быть информирован о правилах кормления и неукоснительно их соблюдать.

СОП №:		Номер версии:		Начало действия:		стр. 6 из 297

2.3.4 Количество корма определяют в соответствии с рекомендованными суточными нормами кормления, если Протоколом исследования не предусмотрен специальный режим кормления.

	Растущие животные (до 8 недель)	Взрослые животные (> 8 недель)
Мыши	5 г	8–10 г
Крысы	20 г	20–40 г

2.3.5 Проверка потребления корма и кормление животных (при необходимости) осуществляют при каждом посещении комнаты. Результат проверки регистрируют в Листе «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных».

2.3.6 Животным обеспечивают свободный доступ к корму. Корм досыпают в кормовое углубление раздаточным ковшом. Если остатки корма забирают из кормового углубления, этот корм нельзя досыпать в другие клетки!

2.3.7 Выполнение процедуры кормления отмечают ежедневно в форме «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных» в графе «Корм дан».

2.3.8 Запас стерилизованного корма для кормления животных хранят в металлическом шкафу с плотно закрывающимися дверцами.

2.4. Поение животных

2.4.1 Животные всегда должны быть обеспечены достаточным количеством питьевой воды.

2.4.2 В клетку МАК-4 при групповом содержании животных помещают бутылочку на 700 мл, в другие клетки – бутылочки на 300 или 500 мл.

2.4.3 Проверку количества воды в бутылочке выполняют при каждом посещении комнаты. Полную смену бутылочек с водой проводят два раза в неделю. Нельзя доливать воду в бутылочку из системы водоснабжения или из других бутылочек!

2.4.4 Выполнение процедуры поения отмечают в форме «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных» – в графе «Смена бутылочек» указать количество смененных бутылочек.

2.5 Смена подстила

2.5.1 Подстилом служит нехлорированная бумага или опилки нехвойных пород деревьев.

2.5.2 Подстил заменяют полностью вместе с клеткой и ее аксессуарами (крышкой, разделителями, карточкодержателями) раз в неделю.

СОП №:		Номер версии:		Начало действия:		стр. 7 из 297

2.5.3 Персонал, ухаживающий за животными, обязан заменить подстил при необходимости (в случае сильного загрязнения, промокания и др. и в случае обнаружения трупа в клетке). В этом случае подстил заменяют вместе с клеткой, аксессуары допускается оставить.

2.5.4 Проверку состояния подстила также проводят при утреннем осмотре состояния животных.

2.5.5 Выполнение процедуры смены подстила отмечают в Листе «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных» с указанием отклонений (при их обнаружении).

2.5.6 Если в комнате есть животные для контроля здоровья (сентинелы), необходимо собрать грязный подстил из других клеток и при смене подстила в клетке с такими животными подложить часть грязного подстила (до 50%). Таким образом, в клетках с животными для контроля здоровья подстил никогда не бывает абсолютно чистым.

2.6 Смена стеллажей

2.6.1 Смену стеллажей осуществляют еженедельно вместе со сменой подстила.

2.6.2 Выполнение процедуры смены стеллажей отмечают в форме «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных».

3. ПРИЛОЖЕНИЕ

1.1. Форма-бланк «Рутинные манипуляции в комнате содержания животных»

Название организации *SOP*

Дата начала действия

РУТИННЫЕ МАНИПУЛЯЦИИ В КОМНАТЕ СОДЕРЖАНИЯ ЖИВОТНЫХ

ANIMAL HUSBANDRY & CARE RECORD

Номер комнаты room number	вид/линия SPECIES / STRAIN	код исследования STUDY NUMBER	месяц / год month / YEAR

Дата – Date	Проверка состояния/ смертности Mortality / Moribundity Checks		Проверка корма Chow Checked		Корм дан – Chow Fed	Проверка питья Water Checked		Смена бутылочек – Bottles Changed	Смена клеток с подстилом – Cages Changed	Смена стеллажей Racks Changed	Влажная уборка полов Floor Mopped	Санитария комнаты Room Sanitized	Подпись – Signature
	Время Time AM	Время Time PM	Время Time AM	Время Time PM		Время Time AM	Время Time PM						
1													
2													
3													

31													

*Примечания (Notes):*___

Второй раздел программы может содержать список СОП по манипуляциям с животными.

- ✓ Идентификация животных.
- ✓ Формирование групп животных для исследования.
- ✓ Фиксация животных.
- ✓ Взвешивание животных.
- ✓ Подкожная инъекция.
- ✓ Внутрибрюшинная инъекция.

- ✓ Внутримышечная инъекция.
- ✓ Введение вещества зондом в желудок
- ✓ Внутрикожная инъекция.
- ✓ Внутривенная инъекция.
- ✓ Взятие крови из хвоста.
- ✓ Взятие крови из орбитального синуса.
- ✓ Взятие крови из поверхностной вены бедра.
- ✓ Терминальный забор крови.
- ✓ Клинический осмотр.
- ✓ Руководство по эвтаназии.
- ✓ Эвтаназия в CO_2-камере.
- ✓ Анестезия грызунов.
- ✓ Принципы хирургии грызунов.
- ✓ Категории боли и анальгезия.
- ✓ Контроль потребления корма и воды.
- ✓ Накожное нанесение препаратов.
- ✓ Офтальмоскопия.
- ✓ Процедура гипофизэктомии.

В СОП этого раздела подробно описываются манипуляции с животными: распределение животных по группам и их идентификация; различные способы введения исследуемых веществ и забора проб для анализа; хирургические операции и требования, предъявляемые к помещениям для их проведения; способы стерилизации хирургических инструментов; уход за животными после операции; использование анестетиков и анальгетиков; контроль и учет наркотических средств.

Образец СОП «Фиксация крысы»

СОП №:		Номер версии:		Начало действия:		стр. 151 из 297

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

«ФИКСАЦИЯ КРЫСЫ»

Составлено:
разработчик Дата

Рассмотрено:
ветеринарный врач Дата

Утверждено:
менеджмент Дата

Форма обучения: _√_ Чтение __√___ Практические занятия

1. ЦЕЛЬ:

1.1. Данная стандартная операционная процедура (СОП) описывает процедуру взятия и фиксации крысы для выполнения манипуляций.

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

2.1 СОП предназначена сотрудникам, выполняющим манипуляции с животными.

3. ОПИСАНИЕ

3.1 Способ I – Взятие крысы для переноса в другую клетку.

Для переноса небольших крыс, а также агрессивных крыс взять животное за хвост ближе к основанию, вынуть из клетки содержания и перенести в другую клетку. Не держать животное долго на весу, так как это его стрессирует.

3.2 Способ II – Фиксация в руке для выполнения манипуляций

Взять крысу за основание хвоста и вынуть из клетки содержания; поместить животное на поверхность стола или на крышку клетки. Не держать крысу за хвост на весу длительное время, так как это стрессирует животное.

Охватить рукой грудную клетку, фиксируя одну или обе передние лапы между пальцами руки. Придерживать хвост и задние лапы.

СОП №:		Номер версии:		Начало действия:		стр. 152 из 297

3.3 Способ III – Фиксация в руке для выполнения манипуляций

Взять крысу за основание хвоста и вынуть из клетки содержания; поместить животное на крышку клетки содержания, на поверхность стола или дать зацепиться ей за халат, посадив на рукав или впереди на халат.

Несильно, но уверенно прижать животное к поверхности стола, держа за шкуру на спине, и собрать шкуру в руку, тем самым обездвиживая животное. Придерживать хвост другой рукой или зажать его между пальцами той же руки. Этот способ фиксации удобен для введения веществ зондом, так как максимально расправляет шею и пищевод, а также для внутрибрюшинных инъекций, так как позволяет натянуть кожу на брюхе.

СОП №:		Номер версии:		Начало действия:		стр. 153 из 297

3.4 Способ IV – Метод Камилы.

Накинуть сверху на крысу тканую салфетку. Зафиксировать животное, охватывая рукой грудную клетку поверх салфетки. Метод позволяет зафиксировать агрессивных и возбужденных животных.

3.5 Способ V – Фиксация в специальном устройстве для выполнения технических манипуляций.

Способ используется для внутривенной инъекции в хвостовую латеральную вену и для взятия крови из хвостовой вены. Подготовить специальный бокс для фиксации крыс. Достать животное из клетки, поместить его на ровную поверхность перед открытым боксом, мягко направить крысу в бокс, придерживая ее за хвост. Закрыть бокс (Рис. 5).

3.6 Взятие детенышей.

Перенос детенышей крыс осуществляется осторожно за кожу холки или за все туловище. Новорожденных переносят по несколько особей в ладонях, можно с небольшим количеством подстила (Рис. 6).

Третий раздел программы может быть посвящен СОП по работе Комиссии по гуманному содержанию и использованию лабораторных животных:

- ✓ Комиссия по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных.
- ✓ Заполнение протокола-заявки в биоэтическую комиссию.
- ✓ Рассмотрение протоколов-заявок на лабораторных животных.
- ✓ Проверка и оценка программы по уходу и работе с лабораторными животными.

СОП данного раздела описывают: кем организована Комиссия по гуманному обращению с животными, ее состав и обязанности; как осуществляется обучение новых членов Комиссии; как часто проводятся совещания Комиссии и какие вопросы на них обсуждаются; как оценивается соответствие требованиям Политики по работе с лабораторными животными; как оформляется протокол-заявка на работу с животными, и как она рассматривается Комиссией; как инспектируются работы по утвержденным протоколам-заявкам.

Образец СОП «Введение вещества в желудок крысам и мышам с помощью специального зонда»

СОП №:	Am/9	Номер версии:	2	Начало действия:		стр. 155 из 297

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

«ВВЕДЕНИЕ ВЕЩЕСТВ ЗОНДОМ В ЖЕЛУДОК»

Составлено: Дата

____

Рассмотрено: ________ Дата

Утверждено: Дата

Форма обучения: _√_ Чтение __√__ Практические занятия

Внесенные изменения и дополнения в новую версию:	
3.4.3	Уточнено как часто необходимо измерять расстояние, на которое можно вводить зонд.
3.4.5., 3.4.6.	Пункты добавлены

1. ЦЕЛЬ:

1.1. Данная стандартная операционная процедура описывает манипуляцию введения вещества в желудок крысам и мышам с помощью специального зонда.

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП И ОТВЕТСТВЕННОСТЬ:

2.1 СОП предназначена сотрудникам, выполняющим манипуляции с животными. Сотрудники должны уметь правильно фиксировать животных и вводить зонд с минимальным отрицательным воздействием на животное.

3. ОПИСАНИЕ

3.1 Основные принципы

С помощью зонда вводятся растворы, суспензии, эмульсии веществ в желудок. Такое введение вещества имитирует пероральное потребление препарата человеком, но по сравнению с другими способами введения в пищеварительный тракт животным (с кормом или с питьевой водой) обеспечивает более точное дозирование вещества.

3.2 Устройство зондов

3.2.1 Зонд для введения в желудок представляет собой стальную слегка изогнутую трубку, на конце которой наварено округлое утолщение

в форме шарика или оливы (чтобы легко проникать в пищевод, не травмируя его). Трубка надевается на шприц (одноразовый пластиковый или многоразовый стеклянный).

3.2.2 Размеры:

a) диаметр оливы: около 4 мм для крыс и около 1,5 мм для мышей;
b) длина трубки: 9–10 см для крыс и 3–4 см для мышей;
c) толщина трубки: не более 2,5 мм для крыс, и 1 мм для мышей.

СОП №:		Номер версии:	2	Начало действия:	.	стр. 156 из 297

3.3 Объем введения
Оптимальный объем введения – 10 мл/кг, максимальный – 40 мл/кг. Объем введения рассчитывается в соответствии с весом тела животного.

3.4 Порядок действий:

3.4.1 Набрать вещество в шприц-зонд. При наборе избегать попадания в шприц воздуха. При попадании воздуха следует осторожно стравить его, избегая потери вещества. При наборе в шприц-зонд суспензии следить за тем, чтобы суспензия была равномерно перемешана!

3.4.2 Животное стандартно зафиксировать в одной руке и держать головой вверх, брюшной стороной к себе. Стараться максимально выпрямить голову животного для распрямления пищевода.

3.4.3 Измерить трубкой зонда длину от кончика носа животного до последнего ребра. Это расстояние, на которое можно вводить трубку. При использовании стандартных зондов и животных одного веса эту процедуру достаточно выполнить один раз перед началом введения.

3.4.4 Поместить закругленное окончание трубки в уголок рта и медленно (без усилий и вращательных движений!) продвигать трубку вперед, наблюдая за глотательным рефлексом. Трубка должна легко пройти в пищевод на нужную глубину. Если трубку ввести неглубоко, то велика вероятность проникновения вещества в дыхательную систему.

3.4.5 Ввести жидкость из шприца. (При правильном введении жидкость выходит из шприца свободно, без затруднений, при этом не наблюдается ее вытекания из ротовой или носовой полости.)

3.4.6 Вынуть зонд, вернуть животное в клетку, обратить внимание на наличие признаков затрудненности дыхания, пены вокруг рта. В случае появления подобных признаков убедиться, что животное может дышать.

Образец СОП «Подготовка фиксированных органов и тканей к проводке»

СОП №:	His/5.0	Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 157 из 275

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА

«ПОДГОТОВКА ФИКСИРОВАННЫХ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ К ПРОВОДКЕ»

Составлено:
Дата

Рассмотрено:
Дата

Утверждено:
Дата

Форма обучения: ___√__ Чтение ___√__ Практические занятия

1. ЦЕЛЬ:

1.1. Представить основные правила и технику подготовки фиксированных тканей и органов к проводке.

2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ СОП:

2.1. Всему персоналу, принимающему участие в работе патоморфологической группы.

3. ВЫПОЛНЕНИЕ

3.1. Общие правила подготовки тканей и органов к проводке, после фиксации в 10% нейтральном формалине (обезвоживание тканей с последующей пропиткой парафином).

- Извлечь из банки с фиксатором орган, быстро всполоснуть в стакане с проточной водой.
- Из фиксированного объекта (ткань, орган или фрагмент органа) аккуратно вырезать фрагмент из нужного места (см. ниже пункт 3.2.) толщиной примерно 3 мм, площадью примерно 0,5–2,5 см^2. В отдельных случаях толщина фрагмента может быть больше, но не более 5 мм, так как высота одноразовой кассеты Turboflow 5 мм.
- Вырезанные образцы поместить в промаркированную кассету [2]СОП № His/2.0 «Маркировка образцов тканей, блоков, стекол».
- Остатки органов поместить обратно в банку с фиксатором.
- Органы, состоящие из костной ткани или включающие ее в структуру, после фиксации подлежат декальцинации, [1]СОП № His/4.0

«Декальцинация костной ткани». Из декальцинированного органа вырезать фрагмент из нужного места (см. ниже пункт 3.2).

- Вырезанные фрагменты тканей или органов промыть в проточной воде в течение 2–3 часов, если ткани или органы находились в 10% нейтральном формалине не более 7 суток. При более длительном нахождении тканей и органов в формалине вырезанные фрагменты отмывать от фиксатора в течение 12–24 часов, в зависимости от длительности нахождения исследуемых объектов в фиксаторе. Отмывание способствует удалению формалина и обеспечивает в дальнейшем более равномерную окраску срезов.

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 2 из 297

- Отмывание фрагментов образцов проводить в больших емкостях, размер подбирать в зависимости от количества исследуемого материала. Фрагменты образцов в кассетах поместить в емкости и поставить под струю холодной водопроводной воды.
- Отмытые от формалина фрагменты образцов слегка подсушить, дав воде стечь.
- Подсушенные образцы в кассетах далее подлежат проводке.

3.2. Правила взятия образцов из фиксированных органов и тканей (Рис. 6). На рис. 7 приведены обозначения встречаемые на схемах органов или систем органов.

[1] *СОП № His/2.0 «Маркировка образцов тканей, блоков, стекол».*
[2] *СОП № His/4.0 «Декальцинация костной ткани».*

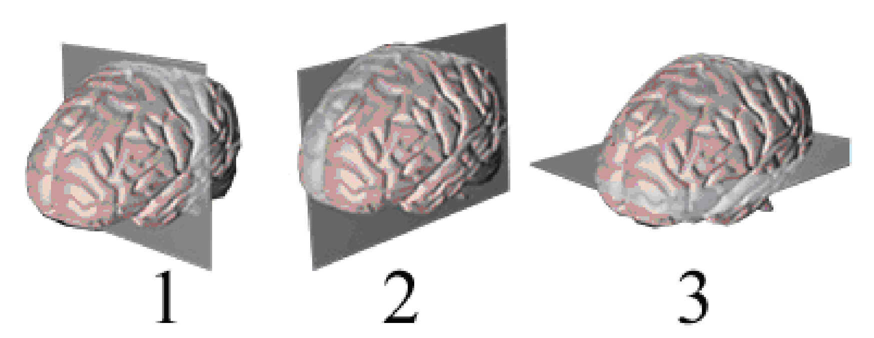


Рис. 6. Схема расположения трех различных анатомических плоскостей относительно естественного положения органов в организме животного и с учетом анатомического строения органов.
1. Фронтальная. 2. Сагиттальная. 3. Горизонтальная

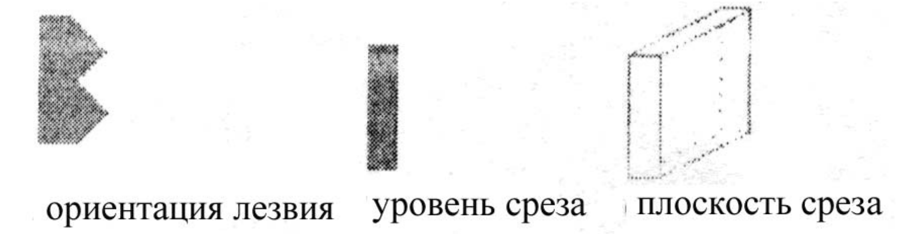


Рис. 7. Обозначения, которые могут встретиться на схемах органов или систем органов

Молочная железа с участком кожи

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм через середину молочной железы во фронтальной плоскости (Рис. 8). Обозначения cranial означает «ближе к голове», caudal – «ближе к хвосту».

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 3 из 297

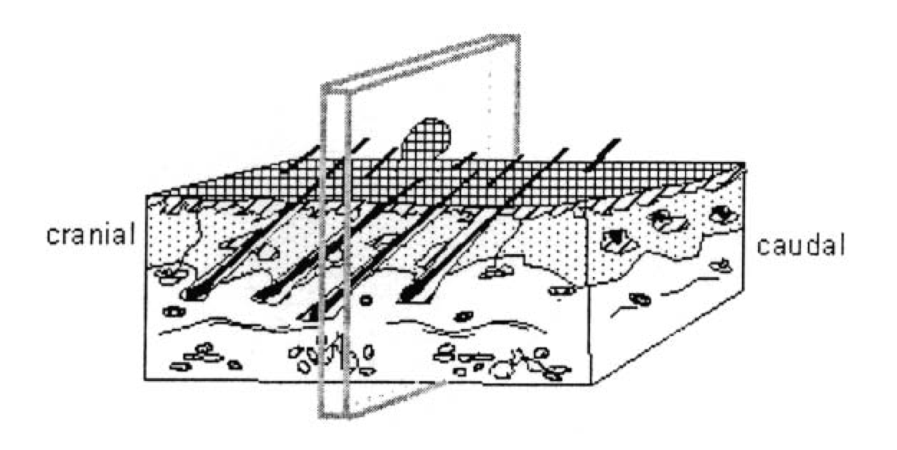


Рис. 8. Схема биопсии фрагмента молочной железы

Мочевой пузырь

Орган разрезать на две половины в сагиттальной плоскости (Рис. 9).

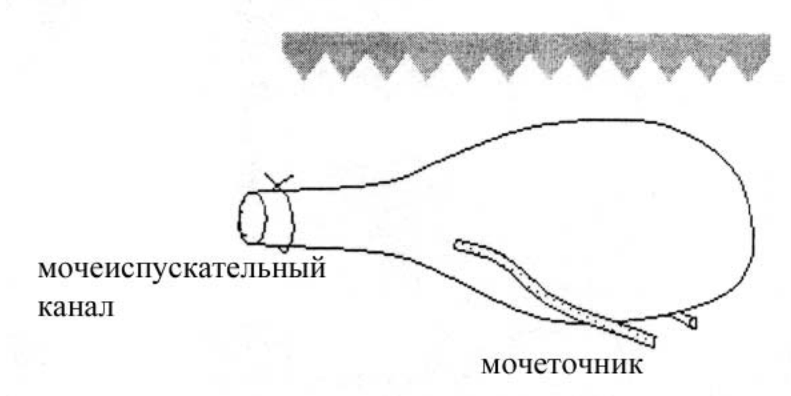


Рис. 9. Схема выполнения сагиттального разреза мочевого пузыря

Предстательная железа

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм из дорсолатеральной и вентральной долей во фронтальной плоскости (Рис. 10).

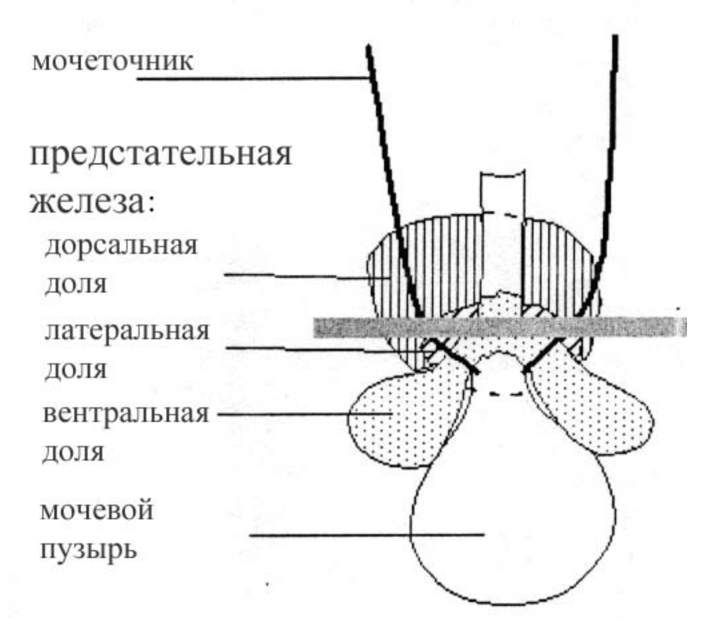


Рис. 10. Схема выполнения фронтального разреза предстательной железы

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 4 из 297

Семенник

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм из области большего диаметра во фронтальной плоскости (Рис. 11).

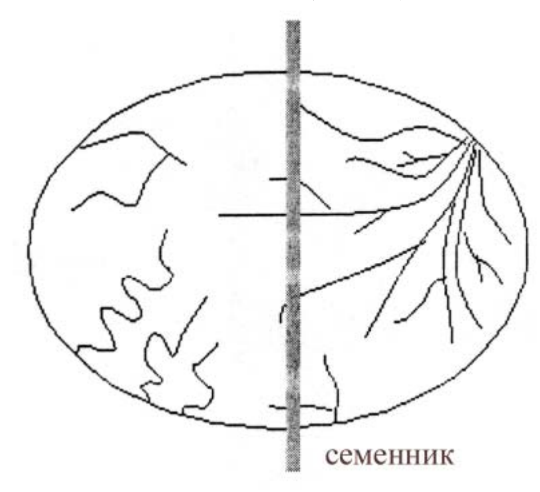


Рис. 11. Схема выполнения фронтального разреза семенника

Семенной придаток

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм из средней части в сагиттальной плоскости (Рис. 12). Обозначения cranial означает «ближе к голове», caudal – «ближе к хвосту».

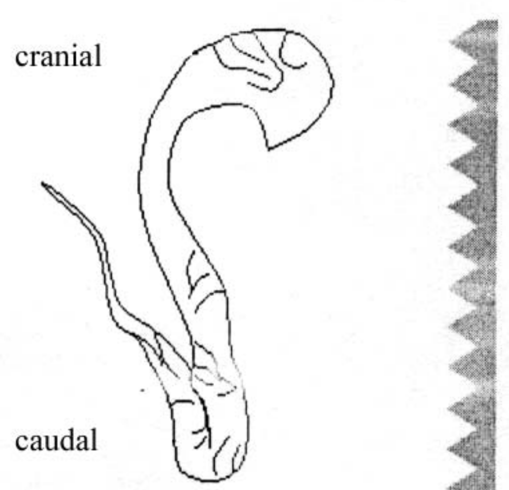


Рис. 12. Схема выполнения сагиттального разреза эпидидимуса

Матка

Вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм из средней части маточных труб во фронтальной плоскости. Разрезать на две половины тело матки, влагалище по средней линии в горизонтальной плоскости (Рис. 13).

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 5 из 297

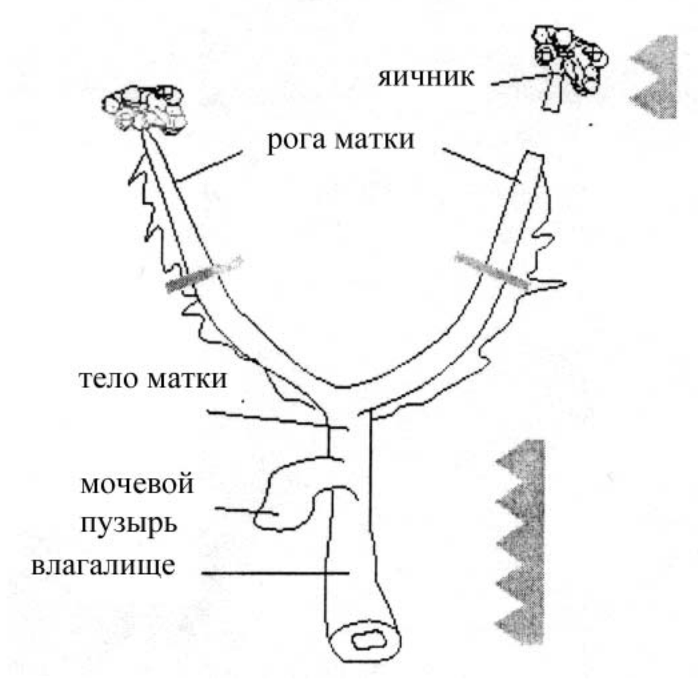


Рис. 13. Схема выполнения разрезов матки

Яичник

Разрезать на две половины по средней линии в горизонтальной плоскости (Рис. 14).



Рис. 14. Схема выполнения разреза яичника.

Семенные пузырьки

Вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм из средней области семенных везикул и коагулирующей железы во фронтальной плоскости (Рис. 15).

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 6 из 297

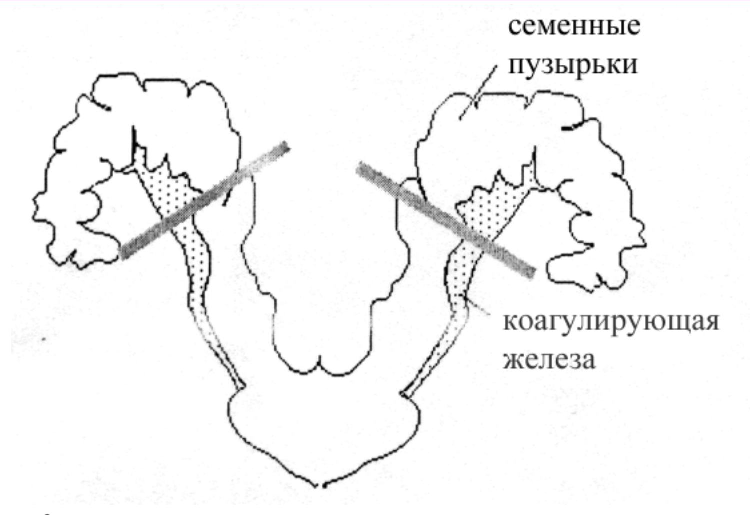
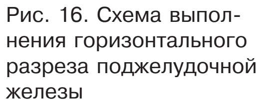


Рис. 15. Схема выполнения разрезов семенных пузырьков

Поджелудочная железа

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм из нижней части левой доли в горизонтальной плоскости (Рис. 16)



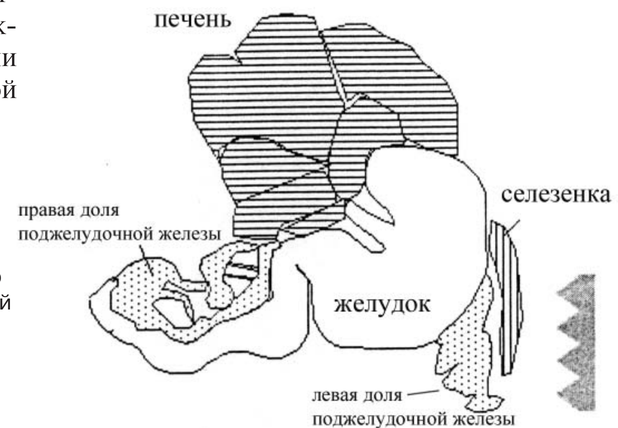


Рис. 16. Схема выполнения горизонтального разреза поджелудочной железы

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действи-телен до:		стр. 7 из 297

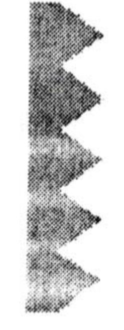
Селезенка

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм из средней части во фронтальной плоскости (Рис. 17).

Рис. 17. Схема выполнения фронтального разреза селезенки

Лимфатический узел

Из лимфатических узлов фрагменты не вырезаются. При нарезке на секции плоскость среза должна пройти через среднюю часть в горизонтальной плоскости (Рис. 18).



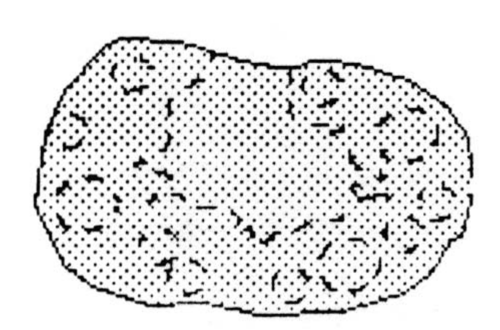


Рис. 18. Схема выполнения горизонтального разреза лимфатических узлов

Кишечник

Из каждого отдела кишечника, представленного на Рис. 19. вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм во фронтальной плоскости.

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действи-телен до:		стр. 8 из 297

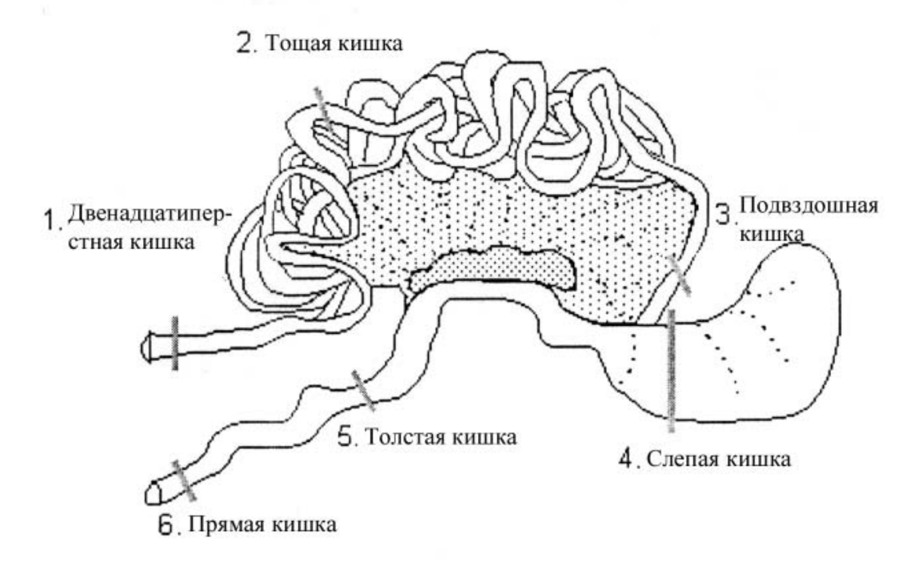


Рис. 19. Схема выполнения разрезов кишечника

Желудок

Вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм из центральной части кардиального отдела через пилорус в сагиттальной плоскости и из свода желудка во фронтальной плоскости (Рис. 20).

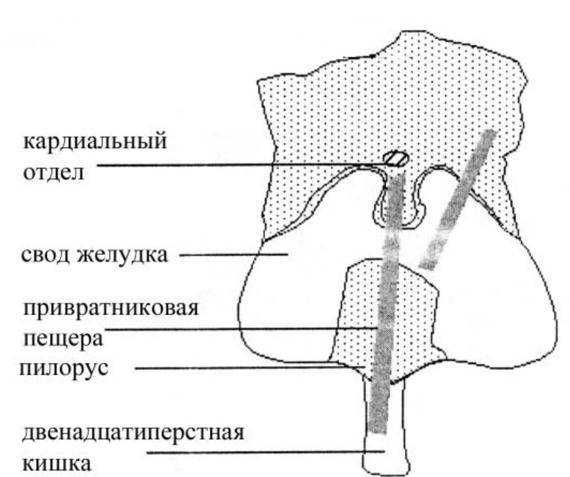


Рис. 20. Схема выполнения разрезов желудка

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 9 из 297

Почки

Из одной почки вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм через весь орган из средней части в сагиттальной плоскости, из второй почки вырезать фрагмент толщиной 2 мм из средней части, включающей ворота почки во фронтальной плоскости (Рис. 21).

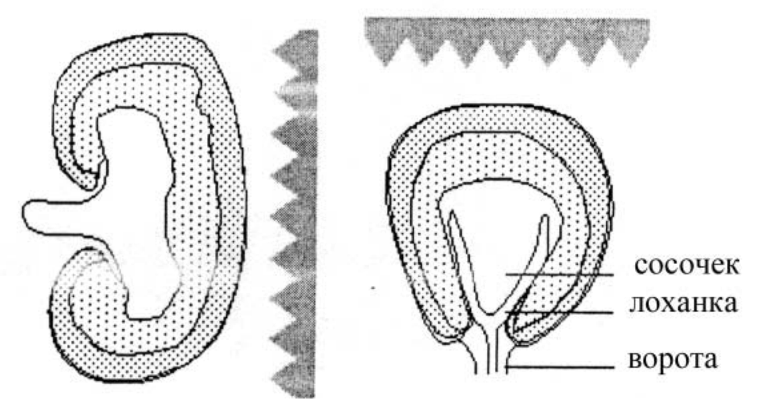


Рис. 21. Схема выполнения разрезов почек

Надпочечник

Разрезать орган на две половины в сагиттальной плоскости (Рис. 22).

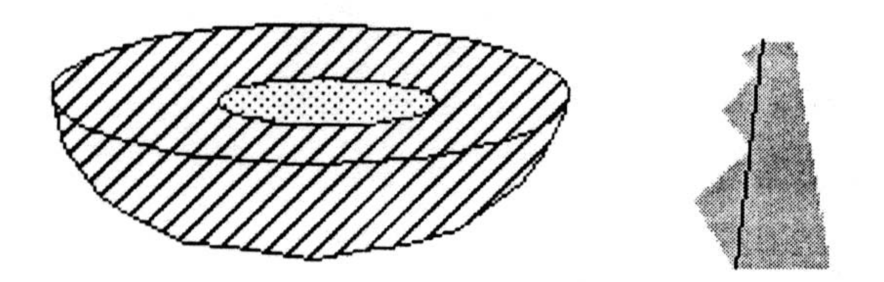


Рис. 22. Схема выполнения разреза надпочечников

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 10 из 297

Печень

Вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм из средней части каудальной, левой латеральной, правой латеральной долей во фронтальной плоскости (Рис. 23).

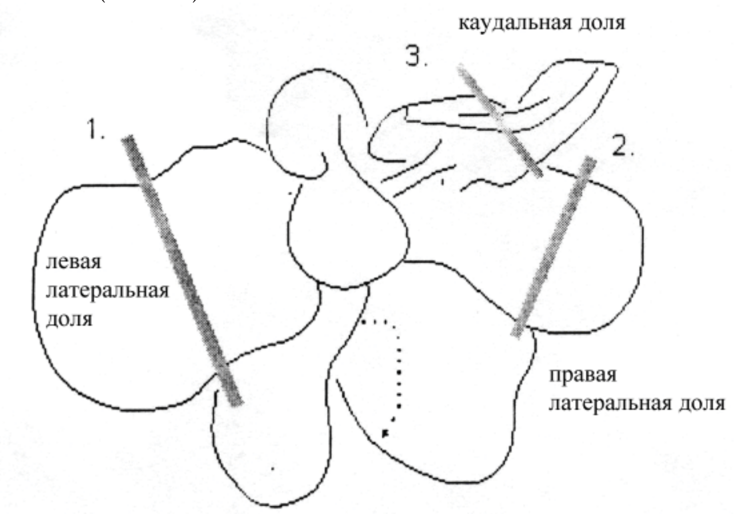


Рис. 23. Схема выполнения разрезов печени

Аорта

Вырезать фрагмент из указанного на рисунке отдела толщиной примерно 3 мм во фронтальной плоскости (Рис. 24).

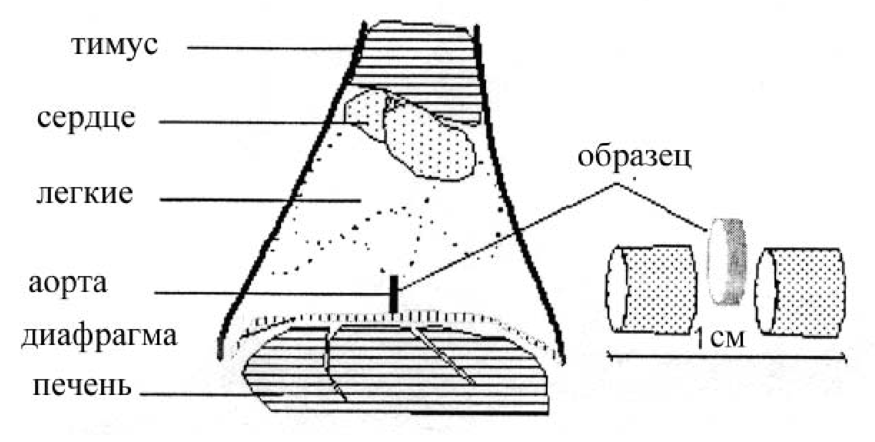


Рис. 24. Схема выполнения фронтального разреза аорты

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 172 из 297

Грудина

Удалить рукоятку и мечевидный отросток как показано на верхнем рисунке, разрезать орган на две половины в горизонтальной плоскости (Рис. 25).

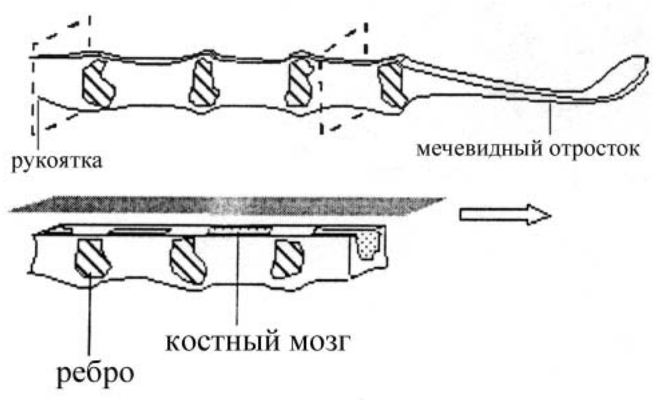


Рис. 25. Схема выполнения горизонтального разреза грудины

Подчелюстная слюнная железа

Разрезать орган на две половины в сагиттальной плоскости (Рис. 26).

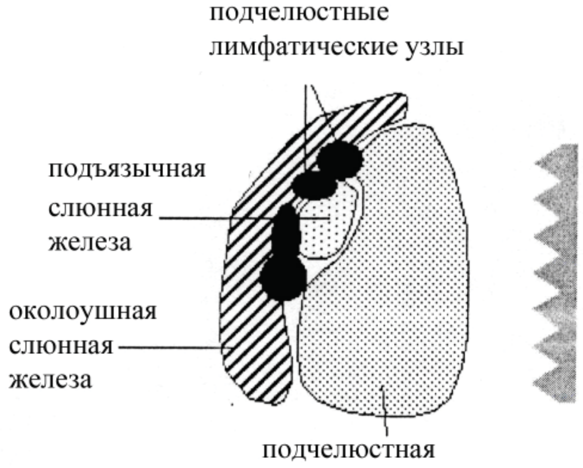


Рис. 26. Схема выполнения сагиттального разреза подчелюстной слюнной железы

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действителен до:		стр. 173 из 297

Комплекс органов, состоящий из трахеи, пищевода, щитовидной железы

Вырезать фрагмент толщиной примерно3 мм как показано на Рис. 27 из области щитовидной железы, включающей паращитовидную железу, во фронтальной плоскости. У крыс и мышей паращитовидная железа как анатомическая структура не определяется визуально, а включена в структуру щитовидной железы.

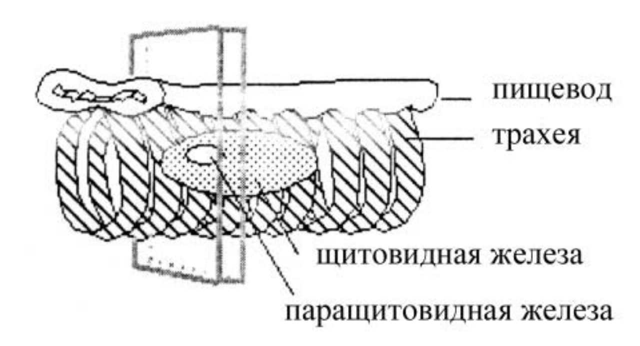


Рис. 27. Схема выполнения фронтальных разрезов щитовидной железы

Тимус

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм через всю поверхность одной из долей как показано на Рис. 28.

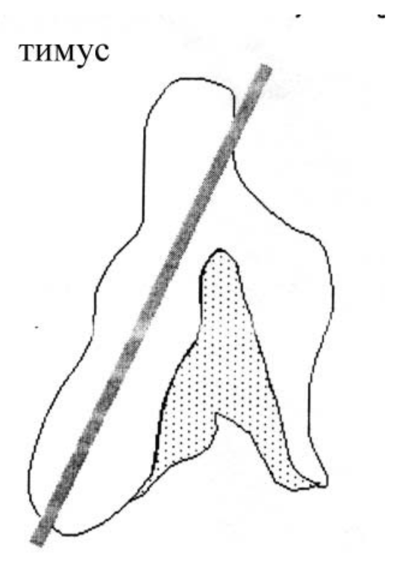


Рис. 28. Схема выполнения разреза тимуса

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действи-телен до:		стр. 174 из 297

Сердце

Вырезать фрагмент толщиной 2–3 мм из средней части органа, включая дугу аорты во фронтальной плоскости (Рис. 29)

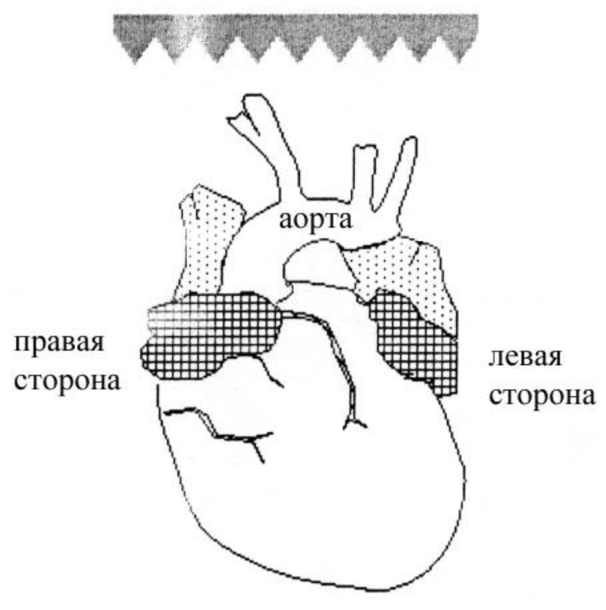


Рис. 29. Схема выполнения разреза сердца

Легкие

Вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм из средней части правой краниальной и каудальной долей и из средней части левой доли как показано на Рис. 30.

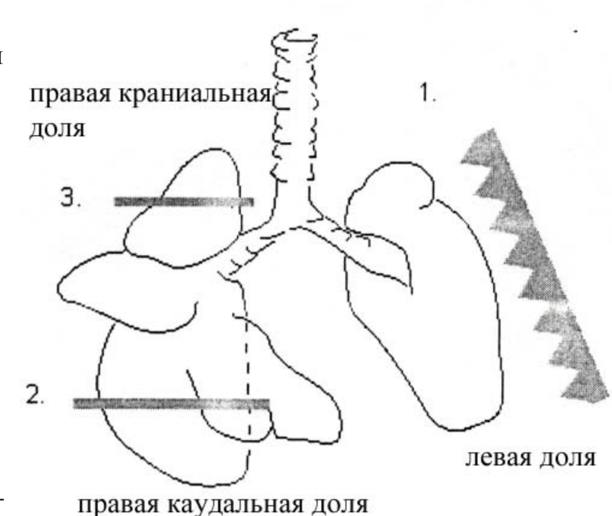


Рис. 30. Схема выполнения разрезов легких

СОП №:		Номер версии:	1	Начало действия:		Действи-телен до:		стр. 175 из 297

Двуглавая мышца бедра с седалищным нервом

Вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм в горизонтальной и сагиттальной плоскости относительно седалищного нерва (Рис. 31).

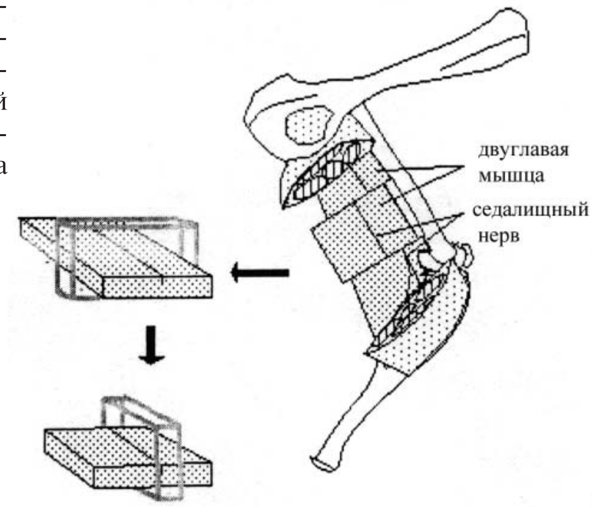


Рис. 31. Схема выполнения разрезов двуглавой мышцы бедра

Коленный сустав с участками бедренной и большеберцовой костей

Вырезать фрагмент толщиной примерно 3 мм из средней части в сагиттальной плоскости (Рис. 32).

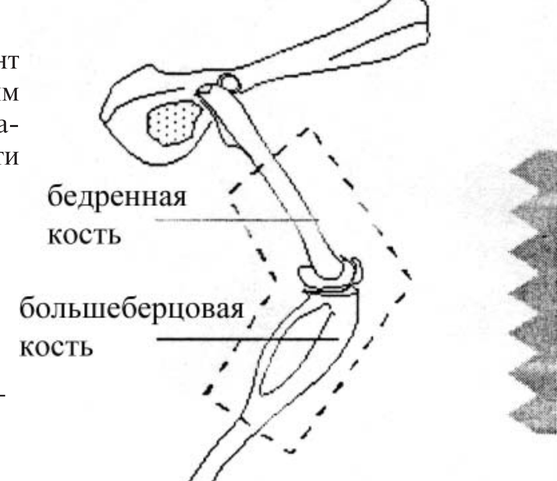


Рис. 32. Схема выполнения сагиттального разреза коленного сустава

Головной мозг

Вырезать фрагменты толщиной примерно 3 мм из трех областей мозга: из области зрительной хиазмы, задней части гипоталамуса, средней части мозжечка и моста во фронтальной плоскости, как показано на Рис. 33.

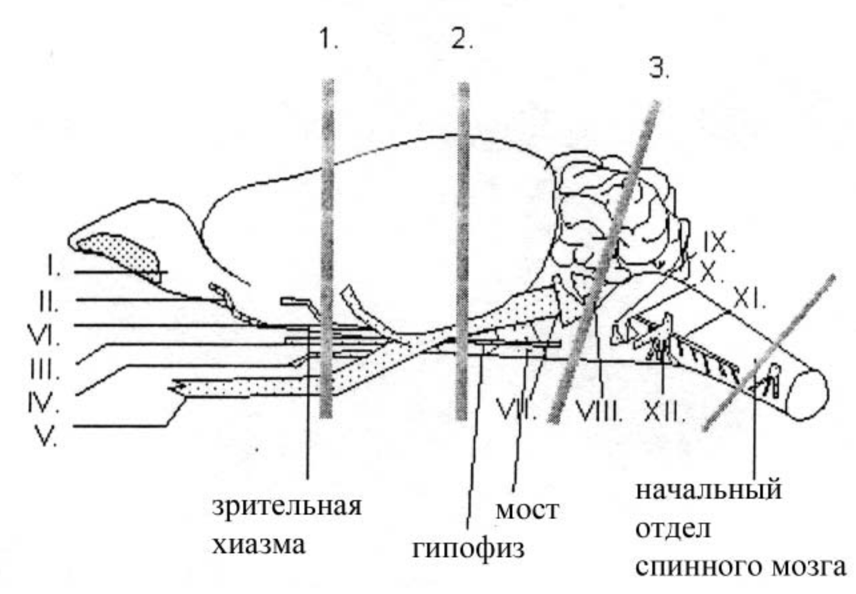


Рис. 33. Схема выполнения разрезов головного мозга

Гипофиз

Разрезать орган параллельно каудодорсальной поверхности во фронтальной плоскости (Рис. 34)



Рис. 34. Схема выполнения разреза гипофиза

Глаз

Разрезать орган на две части через зрительный нерв в сагиттальной плоскости (Рис. 35).

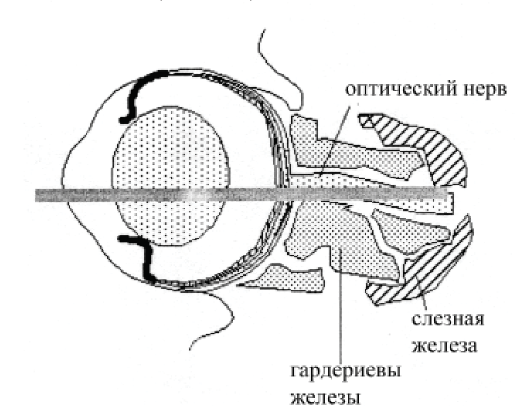


Рис. 35. Схема выполнения разреза глаза

Спинной мозг

Вырезать фрагменты толщиной примерно3 мм из средней части шейного, грудного, поясничного отделов в горизонтальной плоскости (Рис. 36).



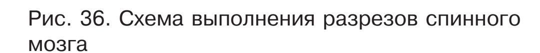


Рис. 36. Схема выполнения разрезов спинного мозга

Глава 11

Специальные биомедицинские исследования

Важнейшими приемами стандартных исследований на животных являются регистрация и анализ поведения животных, функций дыхательной и сердечно-сосудистой систем, а также электрокардиография, электроэнцефалография, электромиография и т.д. Следует помнить, что по своим амплитудно-частотным характеристикам ЭКГ, ЭЭГ и ЭМГ могут существенно различаться у человека и животных. При необходимости проводятся специальные исследования функционирования метаболических систем, экскреторных механизмов и других параметров в соответствии с задачами исследований. В данной главе приведены основные методические подходы, используемые в НЦБМТ РАМН и Лаборатории биологических испытаний ИБХ имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Исследования сердечно-сосудистой системы с помощью катетерной технологии

Для регистрации параметров сердечно-сосудистой системы используют метод регистрации артериального давления и частоты сердечных сокращений и методом изучения тонической и рефлекторной кардиохронотропной регуляции. Оценка АД и ЧСС осуществляется непрямым методом регистрации с помощью хвостовой манжетки.

При использовании катетерной технологии регистрации артериального давления (АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) животному имплантируют катетер в брюшную аорту через бедренную артерию или грудную аорту через левую сонную артерию. Через 24–48 часов после операции по вживлению катетеров животное может быть использовано

для проведения хронических опытов. Во время измерения АД свободный конец артериального катетера подсоединяют к электроманометру, обработку сигнала от которого производят с помощью системы компьютерного анализа, позволяющего рассчитывать систолическое, диастолическое, среднее АД и ЧСС.

Операцию по вживлению катетера в брюшную аорту через бедренную артерию, в отличие от катетеризации вены проводят таким образом: на артерии сначала перевязывают наружную лигатуру и натягивают ее зажимом, а потом берут в зажим внутреннюю лигатуру. Таким образом, между лигатурами будет находиться участок сосуда, заполненный кровью. Делают надрез стенки артерии, вводят в него катетер, свободный конец которого выводят в межлопаточную область, где его и закрепляют аналогичным образом, как и венозный катетер.

Вживление катетера в грудную аорту через левую сонную артерию выполняют следующим образом:

- ✓ делают разрез кожи в области шеи по средней линии и осторожно, не повреждая нервы, выделяют левую общую сонную артерию, используя для этого палочки, на концах которых накручены ватные тампоны;
- ✓ под сосуд подводят три лигатуры (наружную – ближе к голове, среднюю и внутреннюю – ближе к грудной клетке), на которых делают петли;
- ✓ сосуд перекрывают наружной лигатурой, делая на ней два узла, концы лигатуры берут в зажим;
- ✓ концы внутренней лигатуры берут также в зажим, лигатуру подтягивают и сосуд пережимают, средняя лигатура остается свободной;
- ✓ в участке сосуда между лигатурами, заполненном кровью, ближе к наружной лигатуре делают надрез или прокол в стенке сосуда, в который вводят кончик катетера;
- ✓ катетер проталкивают до внутренней лигатуры, завязывают один узел на средней лигатуре так, чтобы стенка артерии была прижата к нему, но катетер при этом можно было бы свободно продвигать в глубь сосуда;
- ✓ отпускают внутреннюю лигатуру, проталкивают катетер дальше по сосуду до амортизационного кольца;
- ✓ затягивают петлю на лигатуре, делают еще по одному узлу на лигатурах, лигатуры отрезают, оставляя концы длиной 3–4 мм;
- ✓ катетер промывают, пережимают зажимом, на бранши которого надеты резиновые трубки, шприц отсоединяют, кончик катетера закрывают пробкой;

- ✓ сняв зажим с катетера, пробку проталкивают еще на 1–2 мм, чтобы во внутреннем конце катетера не оставалось крови, и весь катетер был заполнен физиологическим раствором;
- ✓ около амортизационного кольца за участок трубки РЕ-5О катетер подшивают к мышцам;
- ✓ периферический конец катетера выводят в межлопаточную область и закрепляют.

Прямой метод регистрации с помощью радиотелеметрической технологии

При использовании радиотелеметрической технологии регистрации параметров крысам имплантируют миниатюрное устройство для мониторирования АД, ЧСС и двигательной активности. Животных используют в экспериментах спустя 10–14 дней после операции, когда произойдет полное восстановление нормальной циркадианной вариабельности гемодинамических параметров. Это устройство весит около 8 г и состоит из атромбогенного катетера, заполненного специальным гелем, и капсулой из биосовместимого материала. В капсуле размещаются электроманометр, усилитель, радиопередатчик и аккумулятор. Заряд аккумулятора обеспечивает работоспособность устройства до 6 месяцев. При повторном использовании устройства в другом животном его предварительно выдерживают 12 часов в 2% растворе глутарового альдегида.

Операцию по вживлению устройства осуществляют следующим образом:

- ✓ через срединный разрез брюшной мышечной стенки открывают доступ к аорте, участок аорты между почечными и подвздошными артериями берут на лигатуры или клипсы для временной остановки кровотока;
- ✓ стенку аорты прокалывают, в образовавшееся отверстие вводят кончик катетера и продвигают его в глубь сосуда на 1,0-1,5 см;
- ✓ между катетером и стенкой аорты помещают маленькую прокладку из целлюлозной ткани, на место ввода катетера в сосуд наносят капельку медицинского цианакрилатного клея типа МК-2, прокладка препятствует возможности нарушения проходимости аорты под действием клея после снятия лигатур или клипс;
- ✓ капсулу располагают в брюшной полости, подшивая ее к мышцам брюшины;
- ✓ разрез послойно (мышцы и кожу) зашивают.

Радиосигнал, радиус действия которого 20 см, от имплантированного устройства поступает на радиоприемник, размещающийся под клеткой с

животным. Радиоприемник соединяется с блоком ВСМ100. С помощью блока С11PR осуществляется перерасчет АД с учетом атмосферного давления. Блок ВСМ100 соединен с компьютером. Цифровая обработка сигналов осуществляется с помощью программы, которая позволяет рассчитывать систолическое, диастолическое, среднее АД и ЧСС, а также двигательную активность животного.

Непрямой метод регистрации с помощью хвостовой манжетки

Измерение систолического АД и ЧСС проводят с помощью датчика-клипсы и пневматической манжетки, которые фиксируются на хвосте. С помощью датчика-клипсы регистрируют пульс в хвостовой (каудальной) артерии. При нагнетании воздуха в манжету артерия пережимается и пульс пропадает. Затем при выпускании воздуха из манжетки давление в ней падает, и пульс появляется вновь. То давление, измеренное в манжете, при котором вновь появляется пульс, соответствует систолическому АД.

Во время измерения АД животное помещают в клетку-пенал для ограничения подвижности и уменьшения погрешности измерения. Начинают измерения через 15–20 минут после помещения животного в клетку-пенал после периода его адаптации, когда оно будет сидеть неподвижно и чувствовать себя относительно комфортно. Для улучшения циркуляции крови в хвосте необходимо поместить его на термостатируемую электрогрелку с температурой 28–30°С. Датчик-клипсу располагают на основании хвоста непосредственно под каудальной артерией. Смещение датчика может приводить к снижению чувствительности измерения

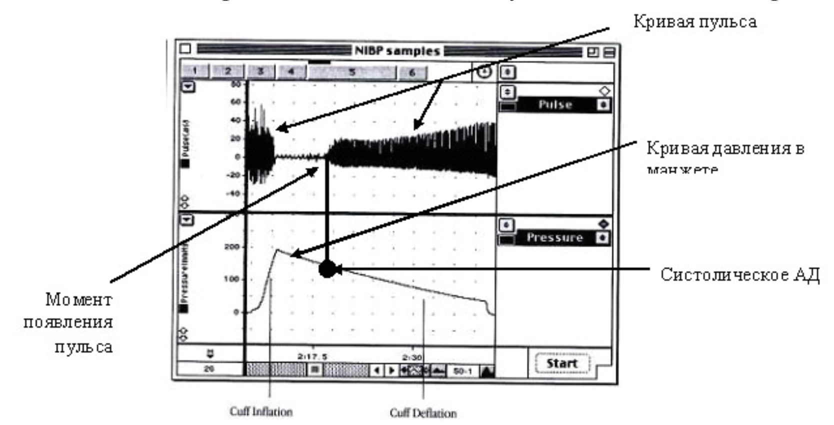


Рис. 37. Пример компьютерной обработки сигнала пульса с хвостовой артерии и давления в манжетке у крысы

и ослаблению получаемого сигнала. После получения четкого сигнала пульса нагнетают в манжетку воздух, сигнал пульса исчезает, после чего воздух из манжетки начинают стравливать. Отмечают, при каком давлении вновь появляется сигнал пульса. Систолическое АД соответствует данному давлению в манжетке (Рис. 37).

Определение уровня тонических вегетативных влияний на сердце

Уровень симпатических и парасимпатических влияний на сердце определяют по изменению ЧСС на фоне парасимпатической или симпатической фармакологической блокады соответственно. Парасимпатическую блокаду осуществляют М-холиноблокатором атропином (1 мг/кг, внутривенно), симпатическую – антагонистом βb_1-адренергических рецепторов атенололом (2 мг/кг, внутривенно). ЧСС регистрируют через 15 мин. после введения атропина или атенолола, после чего вводят другой блокатор и продолжают регистрацию ЧСС еще в течение 30 мин. ЧСС на фоне совместного введения атенолола и атропина в условиях отсутствия симпатических и парасимпатических влияний принимают за частоту водителя ритма, или интракардиальную ЧСС. Уровень симпатических влияний определяют как разность между ЧСС на фоне атропина и интракардиальной ЧСС, уровень парасимпатических влияний – как разность между ЧСС на фоне βb_1-адренергической блокады и интракардиальным ритмом.

Определение кардиохронотропного компонента барорецепторного рефлекса

Тестирование барорефлекса осуществляют, регистрируя ответы ЧСС на искусственное ступенчатое изменение АД при внутривенном введении вазодилататора нитропруссида натрия и вазоконстриктора фенилэфрина гидрохлорида. Возрастающие дозы нитропруссида (0,5; 1; 5; 10 и 25 мкг/кг) и фенилэфрина (0,5; 1; 2; 5 и 10 мкг/кг) вводят с интервалом 10 минут. Кривую зависимости ЧСС от среднего АД для каждого животного подвергают логарифмической аппроксимации, позволяющей определить амплитуду изменения ЧСС, минимальное значение ЧСС, среднее АД, моду среднего АД, коэффициент сигмоидальной зависимости.

Функцию чувствительности барорефлекса рассчитывают как первую производную зависимости ЧСС от среднего АД. Это позволяет установить также чувствительность барорефлекса. За показатель чувствительности барорефлекса принимают максимальное значение полученной параболической функции.

В качестве параметров барорецепторного рефлекса используют также следующие значения: общая амплитуда рефлекторного ответа, плато брадикардии, плато тахикардии, рассчитываемое как $ЧСС_{min}+\Delta ЧСС$, амплитуда рефлекторной брадикардии (разность между плато брадикардии и фоновой ЧСС), амплитуда рефлекторной тахикардии.

Чувствительность барорефлекса можно также определить, регистрируя ответы ЧСС на изменение АД, при однократном внутривенном введении вазодилататора нитропруссида натрия и вазоконстриктора фенилэфрина гидрохлорида. Подбирают такие дозы препаратов, чтобы АД изменялось приблизительно на 20 мм рт.ст. В этом случае чувствительность барорефлекса рассчитывают как отношение максимальных изменений ЧСС к максимальным изменениям АД.

Сравнительная электрокардиография

Электрокардиография производится на электрокардиографе при помощи игольчатых электродов, введенных подкожно (для животных), или накладных (для человека). ЭКГ записывают чаще всего в трех и реже в четырех отведениях. Первое отведение – электроды накладывают на пясти правой и левой конечностей. Второе отведение – электроды накладывают на пясть правой передней конечности и плюсну левой задней конечности. Третье отведение – ток отводят от пясти левой передней конечности и плюсны левой задней конечности. Четвертое отведение – грудное.

Зубцы электрокардиограмм *животных*, как и *человека*, обозначаются буквами P, Q, R, S, T. Наибольшая величина зубцов отмечается во втором отведении (Рис. 38).

На ЭКГ у *собак* рельефно выступает дыхательная аритмия. Принципиально у здоровых собак разных пород характер ЭКГ одинаковый, лишь для восточноевропейских овчарок свойственно увеличение зубцов. Для собак характерным является отрицательный зубец Т чаще всего во всех трех отведениях (рис. 38В).

Величина интервала P–Q равна 0,11 сек, а величина интервала QRS – 0,04-0,05 с. Электрическая ось комплекса QRS составляет 30–70° у беспородных и 30-75° у собак чистых пород. Интервал S–T у большинства здоровых собак размещается на изоэлектрической линии, а в $^1/_3$ случаев пересекает ее снизу вверх (от +0,2 до –0,2 с). Величина интервала

S–T у собак колеблется в пределах 0,04–0,1, а интервала QRST – в пределах 0,16-0,24 с.

В систолическом периоде электрокардиограммы (от начала зубца P до конца зубца T различают:

- ✓ предсердный комплекс – от начала зубца P до начала зубца Q. Зубец P отображает возбуждение предсердий, его вершина соответствует началу систолы предсердий. Интервал P–Q характеризует время, затраченное на передачу возбуждения из предсердий в желудочки;
- ✓ начальную фазу желудочкового комплекса – QRS;
- ✓ конечную фазу желудочкового комплекса от начала зубца T до его конца.

Зубец Q отвечает возбуждению внутренней поверхности мускулатуры желудочков, правой сосочковой мышцы, перегородки, верхушки левого желудочка и основания правого желудочка. Зубец R возникает в результате постепенного охвата возбуждением наружной мускулатуры правого и левого желудочков и основания левого желудочка. Его верхушка соответствует началу систолы желудочков. Высокий зубец R свидетельствует о высоком вольтаже токов сердца, что свойственно хорошему функциональному состоянию мускулатуры сердца или повышенной возбудимости симпатической нервной системы. Низкий зубец R указывает на дистрофические изменения в миокарде.

Отрицательный зубец R в первом и третьем отведениях часто свидетельствует о нарушениях проводящей системы.

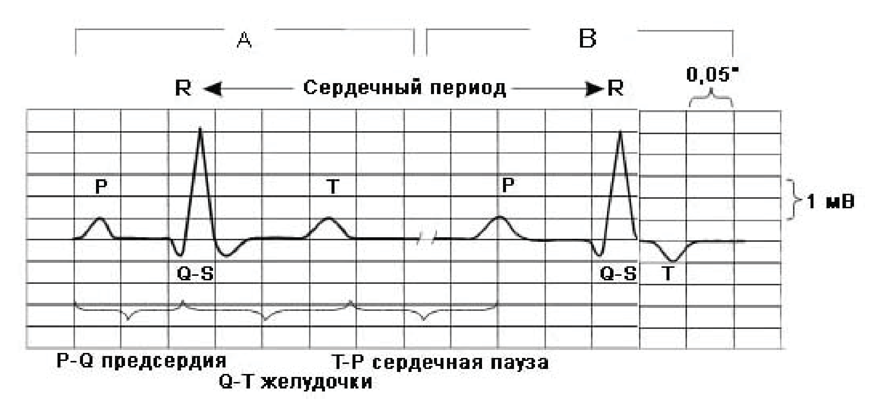


Рис. 38. Сравнительные особенности электрокардиограммы человека (А) и кошек и собак (В) в норме. Следует обратить внимание на зубец T, который у многих животных инвертирован, что следует учитывать в процессах биомоделирования. Инверсия зубца T у человека характеризует грубую патологию, например инфаркт миокарда

Изменение формы комплекса QRS в виде расщепления или притупления зубцов, а также расширение интервала QRS могут указывать на поражение конечных ветвей проводниковой системы и поражение миокарда.

Зубец S совпадает с максимальным возбуждением желудочков. Отрезок S–T находится на изопотенциальной линии ЭКГ и указывает на то, что левый и правый желудочки полностью охвачены возбуждением и в это время происходит их сокращение (рис. 38В).

Зубец T соответствует конечной фазе возбуждения желудочков и в определенной мере отражает состояние биохимических процессов в миокарде.

Вторым периодом ЭКГ является диастолический, охватывающий интервал от зубца T до начала зубца P. Регуляция работы сердца осуществляется экстра- и интракардиальными нервными воздействиями, передаваемыми волокнами симпатических и блуждающих нервов, а также гуморальным путем.

Электрокардиограмма *кошек* имеет следующие особенности: зубец P всегда положительный, его высота — 0,1–0,15 мВ и длительность 0,03–0,04 с. Зубец Q встречается редко или он очень маленький. Зубец R имеет амплитуду 0,3–0,5 мВ. Зубец S маленький. Интервал QRS составляет в среднем 0,04 с. Зубец T в 25% случаев отрицательный, а в остальных – положительный. Положительный зубец T достигает 0,1–0,15 мВ, а отрицательные зубцы – меньше. Интервал QT в среднем равен 0,2 с, а промежуток между зубцами P и Q колеблется в пределах 0,06–0,09 с. (рис. 38В).

Электрокардиограмма *кролика* характеризуется тем, что сегмент RST в большинстве случаев лежит на изолинии. Высота зубца R в третьем отведении несколько большая, чем во втором, и составляет: R_2 – 0,07–0,25 (чаще 0,1–0,15) мВ, а R_3 – 0,08–0,35 (чаще 0,15–0,2) мВ.

Зубец T у кроликов очень высокий, особенно во втором отведении (высота его в два раза больше комплекса QRS). Зубец Q встречается не всегда, во втором отведении всего лишь в 4,8%, а в третьем – 6,3% случаев.

Зубец P в первом отведении очень маленький или отрицательный, а во втором и третьем отведениях всегда положительный, высота его 0,1–0,15 мВ и продолжительность 0,03-0,04 с. Интервалы между зубцами составляют: PQ – 0,07, QRS – 0,04 и QT – 0,14 с.

Запись электрокардиограммы у *морских свинок* производят под наркозом, потому что у ненаркотизированных животных возникают помехи вследствие дрожания мышц.

Зубец P во всех отведениях положительный, особенно выраженный во втором отведении, а в первом и третьем отведениях бывает сглаженным или может отсутствовать. Зубец P_1 имеет амплитуду 0-0,25 мВ. Зубец Q во всех отведениях отсутствует. Интервал от зубца P до точки Q состав-

ляет 0,06–0,08 с. Колебания величин зубца: R_1 – 0,3–1,1 мВ, R_2 – 0,4–1,5 мВ, R_3 – 0,2–0,7 мВ. Зубец S во втором отведении отсутствует, а в первом и третьем отведениях регистрируется в 20% случаев. Длительность интервала QRS у морских свинок составляет 0,02-0,04 с.

Зубцы Т обычно отрицательные (в первом отведении этот зубец довольно часто отсутствует), их величины следующие: T_1 – 0–0,2 мВ, T_2 – 0,05–0,35 мВ, T_3 – 0,05–0,3 мВ. Длительность интервала S–T составляет 0,03–0,12 сек. Длительность интервала QRST – 0,11–0,2 с.

Запись электрокардиограмм у *крыс* чаще всего проводится под наркозом (у ненаркотизированных животных из-за дрожания мышц возникают неустранимые помехи). В первом отведении зубец R очень низкий, а остальные зубцы отсутствуют или с трудом различимы, в связи с этим первое отведение у крыс не имеет никакого значения. Во втором и третьем отведениях регистрируются отчетливые электрокардиограммы.

Зубец Р почти всегда положительный, хотя в редких случаях может быть и отрицательным как во втором, так и в третьем отведениях. Величина P_2 колеблется в пределах 0,1–0,35 мВ, а P_3 – 0,1–0,3 мВ. Их длительность – 0,01–0,02 с.

Зубец Q почти всегда отсутствует во всех отведениях. Интервал P–Q (до точки Q) равен 0,04-0,05 с. Высота зубца R_2 составляет 0,3-0,85 мВ, а R_3 – 0,35–0,7 мВ.

Зубец S во втором отведении встречается в 10,2%, а в третьем отведении – в 37,5% случаев. Интервал S–T у крыс отсутствует, и если на электрокардиограмме отмечается зубец S, то он сразу же переходит в зубец Т, образуя соединение S–T. В подавляющем большинстве случаев зубец S отсутствует, и нисходящее колено зубца R непосредственно переходит в зубец Т. Длительность интервала QRS – 0,01–0,025 с.

Зубец Т всегда положительный, величина его колеблется в пределах: T_2 – 0,3–0,7 мВ, T_3 – 0,35–0,65 мВ, т. е. почти не уступает по величине зубцу R. Интервал QRST составляет 0,07–0,1 с.

Интервал Т–Р, указывающий на величину диастолической паузы, нередко может вовсе отсутствовать – зубец Т сразу же переходит в зубец Р – или составляет 0,01–0,05 с.

Электрокардиограмма *мыши*. Зубец Р во всех отведениях положительный, но небольшой величины. Интервал PR равен 0,016-0,045 с. Зубец R во всех отведениях направлен кверху, но в первом отведении он очень низкий, а наивысшая высота его во втором и третьем отведениях достигает 0,25–0,3 мВ. Интервал QRS составляет 0,02-0,04 с. Зубец S довольно часто отсутствует или слабо выражен. При отсутствии зубца S нисходящее колено зубца R переходит в мелкий отрицательный зубец Т, который в своей конечной части может переходить в положительную фазу. Амплитуда зубца Т составляет 0,07–0,1 мВ.

Мониторирование кардиососудистой системы

Регистрация ЭКГ, систолического артериального давления (СиАД) – частоты сердечных сокращений (ЧСС), частоты дыхательных движений (ЧДД), насыщение гемоглобина кислородом (HbO_2) производятся на кардиомониторе (рис. 39).

Интегральная оценка вегетативной нервной системы проводится методом вариационной пульсометрии программно-аппаратным комплексом (рис. 40–42).

Вариабельность ритма сердца (ВРС) представляет собой один из наиболее информативных показателей активности вегетативной нервной системы (ВНС). Основным методом оценки этого показателя является запись кадиоритмограммы (КРГ) с последующим ее анализом. Для записи КРГ может подойти запись любой пульсовой волны (реограмма, фотоплетизмограмма и др.). Однако если нас интересует ритм сердца, то необходимо оценить источник водителя ритма (зубец Р) и морфологию комплекса QRS. Кроме того, существует понятие «дефицит пульса». Именно поэтому для расчета показателей вариабельности ритма сердца необходимо использовать запись электрокардиограммы.

Ритмограмма – графическое изображение последовательного временного ряда межсистолических интервалов в виде отрезков прямой линии,

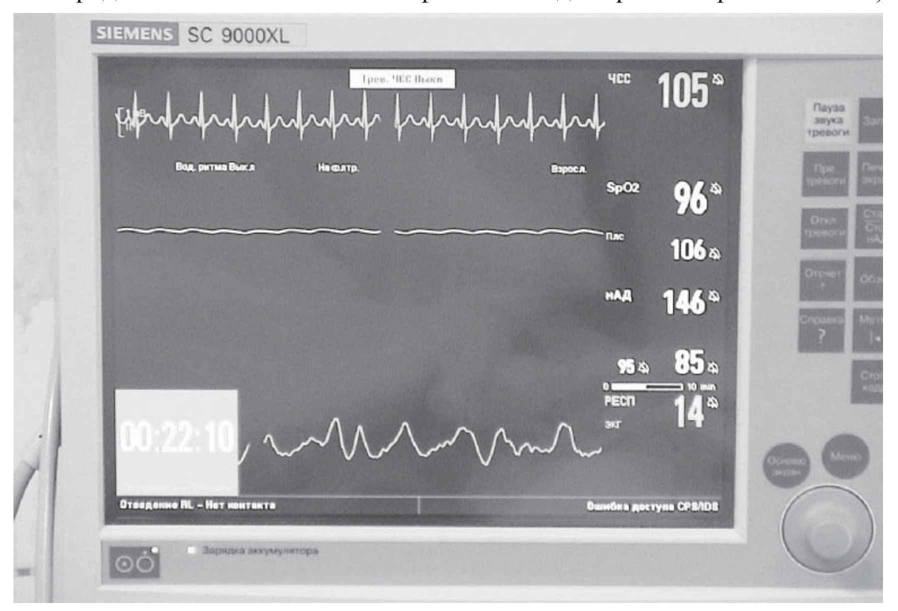


Рис. 39. Пример регистрации ЭКГ на кардиомониторе

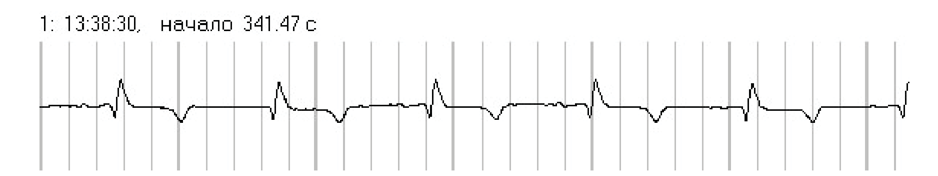


Рис. 40. Пример кривой ЭКГ

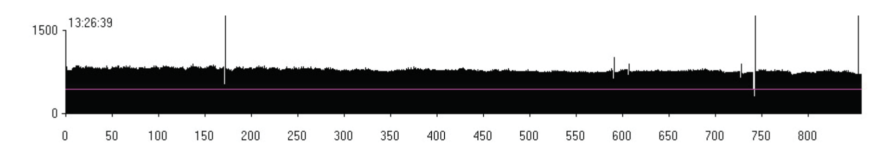


Рис. 41. Пример записи кардиоритмограммы

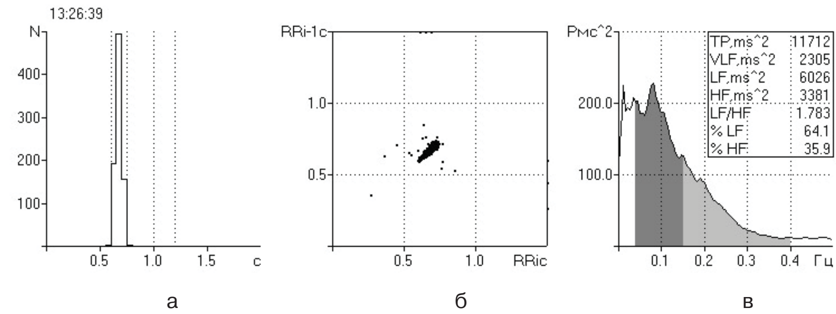


Рис. 42. Вариабельность сердечного ритма (а), скатерограмма (б) и спектрограмма (в)

эквивалентных по длине продолжительности пауз между сокращениями сердца. В норме верхний край КРГ неровный, рисунок этой неровности формируется тремя видами волн различной частотной характеристики: HF, LF, VLF.

Спектральный (частотный) анализ позволяет обнаружить периодические составляющие в колебаниях сердечного ритма и оценить количественный их вклад в динамику ритма.

Ударный индекс (УИ) и минутный объем кровообращения (МОК) оцениваются расчетным методом по результатам анализа реограммы.

ЭЭГ и МЭГ в биомоделировании

Электроэнцефалограмма (ЭЭГ) и магнитоэнцефалограмма (МЭГ) являются единственными объективными показателями работы головного мозга человека и животных в динамике. Они отражают, главным образом, постсинаптическую активность нейронов коры, но не их потенциалы действия и не активность корковых глиальных клеток.

Положительное отклонение потенциала ЭЭГ и МЭГ вызывается либо возбуждающими постсинаптическими потенциалами в глубинных слоях коры, либо тормозными постсинаптическими потенциалами в поверхностных ее слоях, а отрицательное отклонение – противоположными факторами.

Биофизические свойства нейронов человека сходны с активностью нервных клеток животных. Потенциал покоя нейронов составляет от –50 до –80 мВ, а амплитуда их потенциала действия –60–100 мВ при длительности 0,5–2 мс. Потенциалы действия в нейронах возникают в области *аксонного холмика* и распространяются по аксону, по телу и дендритам клетки с частотой импульсации до 1000 Гц.

Между парой электродов или между одним из таких электродов и индифферентным электродом (например, на мочке уха у человека или в кости носовых пазух у животных) наблюдаются непрерывные колебания потенциала. Они называются электроэнцефалограммой (ЭЭГ) или электрограммой мозга (ЭГ). Частота регистрируемых колебаний составляет от 1–50 Гц, а их амплитуда – до 90–120 мкВ.

Частота и амплитуда волн ЭГ зависит от вида животного, расположения электродов и степени бодрствования. Впервые электрические изменения в мозгу в ответ на стимуляцию сенсорных органов зарегистрировал в 1875 г. Р. Катон. В 1929 г. Г. Бергер подтвердил данные Р. Катона уже без стимуляции органов и зафиксировал спонтанные биопотенциалы на коже головы человека, а в 1935 г. Эдриан и Мэтьюз классифицировали эти ритмы.

Ритмы ЭЭГ индуцируются главным образом активностью подкорковых структур, особенно таламуса. При декортикации ритмичная активность таламуса не изменяется. При изучении глубинных структур зрительных бугров обнаружено множество таламических пейсмекеров, генерирующих и поддерживающих ритмичную активность. Выраженным синхронизирующим и десинхронизирующим действием на таламус обладает ретикулярная формация.

Исследования биоэлектричекой активности мозга

За неделю до начала эксперимента животных анестезируют, фиксируют в стереотаксисе, в стерильных условиях эпидурально вживляют электроды, в качестве которых применяют штырьковые разъемы с антикоррозийным покрытием, на пластмассовой платформе, которая уста-

навливается на кости черепа и заливается карбодентом. Регистрацию ЭЭГ осуществляют монополярно, референтный электрод располагают в носовых костях. Все манипуляции осуществлялись в соответствии с международными нормами этического обращения с животными.

Спустя неделю после операции каждое животное помещается в экспериментальную камеру, к разъему на черепе присоединяли контакты и наблюдают за нативной ЭЭГ в течение 15 минут, при этом животное находится в свободном поведении. На следующий день эту процедуру повторяют, но 15 минут регистрируют фоновую ЭЭГ. Далее осуществляется инъекция раствора выбранного вещества в указанной дозе, спустя 3 минуты после введения которого регистрируют ЭЭГ в течение 1 часа. Запись ЭЭГ осуществляют на электроэнцефалографе-анализаторе. Фильтры высоких частот на 70 Гц, постоянная времени составляла 0,3 с, режекторный фильтр удаляет колебания частотой 50 Гц. Частота опроса составляет 250 Гц. После удаления артефактов анализируют изменение спектральной мощности и когерентности электрической активности мозга в стандартных физиологических диапазонах частот: дельта – 1–4 Гц, тета – 4,25–8 Гц, сигма – 8,25–13 Гц, бета – 13,25–30 Гц, гамма – 30,25–45 Гц. Эпоха анализа составляет 4 с.

У *кроликов,* к 10–15-му дню со дня рождения цитоархитектоника коры приобретает вид, свойственный взрослому животному. К этому же времени устанавливается биохимическое и электроэнцефалографическое созревание коры. Спонтанные электрические колебания коры головного мозга впервые появляются у крольчонка старше пяти дней. Электрическая активность коры головного мозга становится сформированной к 10–15-му дню постнатальной жизни кролика. Новорожденный кролик не приспособлен к самостоятельной жизни.

Спонтанные электрические потенциалы коры головного мозга у *морской свинки* регистрируются на 46-49-й день эмбриональной жизни и становятся еще более выраженными у новорожденных. Морские свинки и куры рождаются с хорошо сформированной (морфологически, биохимически и электроэнцефалографически) центральной нервной системой, выполняющей многообразные сложные реакции.

У *крыс* слабо выраженные электрические потенциалы с коры головного мозга регистрируются на пятый день после рождения, и нормальная ЭЭГ отмечается с 15-го дня, хотя морфологическое развитие коры заканчивается раньше, к 10-му дню.

Как и волны ЭЭГ, вызванные потенциалы (ВП) отражают не импульсацию, а прежде всего синаптическую активность нервных клеток. Если регистрировать ВП в разных слоях коры, то форма ВП будет меняться: первоначальное положительное отклонение (верхние слои) исчезнет и

вместо него появится первичная отрицательная волна с коротким латентным периодом. Нижние слои, иными словами, афферентные импульсы вызывают деполяризацию нейронов IV–V слоев коры.

Биопотенциалы записываются как с поверхности обнаженной коры (электрокортикограмма – ЭКоГ), так и с кожи головы. В последнем случае получают интегральную электроэнцефалограмму. Записи ЭЭГ в принципе те же, что и в случае ЭКоГ, но в связи с большим электрическим сопротивлением амплитуда зубцов и частота волн ЭЭГ меньше.

У *животных* и *человека* при закрытых глазах регистрируется основной α-ритм (α-волны с частотой 8–12 Гц, в среднем 10 Гц), или синхронизированная ЭЭГ. При открытых глазах или поступлении сигналов от других органов чувств α-волны исчезают (блокада α-ритма) и сменяются β-волнами с большей частотой (14–30 Гц; в среднем 20 Гц) и меньшей амплитудой. Это десинхронизированная ЭЭГ. Более медленные и высокоамплитудные колебания: θ-волны (тета-ритм: 4–7 Гц, в среднем 6 Гц) и Δ-волны (дельта-ритм: 0,5–3,5 Гц, в среднем 3 Гц), но в норме у людей, в отличие от животных, они выявляются только во сне. В ЭЭГ детей характерны более медленные и нерегулярные ритмы даже в бодрствующем состоянии. «Созревание» четкого α-ритма у детей происходит к 5–7 годам. У животных же (*мини-свиньи, собаки, кошки, кролики, крысы и т.д.*) низкочастотные ритмы в бодрствующем состоянии на протяжении всей жизни. При разложении ЭЭГ быстрым преобразованием Фурье спектральные мощности ЭЭГ животных значительно обеднены в высокочастотной области. Кластерный анализ показал, что единой соотносимой частотой у человека и разных животных является 9±0,75 Гц, причем θ и Δ-волны у животных несут гораздо большую информационную содержательность, чем у человека. У человека же основные информативные характеристики лежат между верхними значениями θ-ритма и нижними и средними Δ-ритма. Это следует строго учитывать при биомоделировании процессов деятельности головного мозга на основе анализа ЭЭГ и ЭКоГ.

При движении электрических зарядов возникает также магнитное поле, т.е. мозг генерирует и *магнитные* волны. Магнитные поля можно зарегистрировать с помощью высокочувствительных датчиков на основе сверхпроводящих квантовых интерференционных устройств. Преимущество этой методики перед ЭЭГ заключается в *повышенной точности* локализации очага корковой активности, поскольку сигналы от соседних участков не накладываются друг на друга.

МЭГ имеет несомненные преимущества перед ЭЭГ, поскольку несет большую, а, главное, новую информацию о функционировании мозга, действии психотропных средств и т.д. В МЭГ гораздо больше *сопоста-*

вимых феноменов между человеком и животным, в частности, в гораздо большем расширении эквивалентного частотного диапазона. Исключительная перспективность МЭГ сдерживается тем, что методики МЭГ на основе жидкогелиевых сверхпроводящих материалов дороги и сложны в эксплуатации ввиду огромных затрат по экранированию от магнитных возмущений Земли и окружающих территорий.

Нейрофизиологи и нейрофармакологи, использующие методы визуализации для замены экспериментов над животными, испытали трудности в привлечении финансирования для целей своей работы. Например, требуется не менее 3–5 лет, чтобы обеспечить финансирование и развертывание мощностей по МЭГ мозга во вновь создаваемых центрах. МЭГ используется в единичных лабораториях США и стран Европы. Для сравнения: Япония имеет 20 лабораторий магнитной энцелофалографии.

Применяемые стратегии финансирования исследований имеют тенденцию не поощрять замену, отказ от использования животных, а находить альтернативы в виде оптимальных подходов в биомоделировании. Развитие новых методов по замене вивисекционных экспериментов над животными рассматривается как пограничная деятельность. Задержки развития новой технологии приводят к более медленному медицинскому прогрессу. Например, аппарат отображения при помощи *магнитного резонанса* (MRI) имеет все увеличивающееся поле применений и может в настоящее время использоваться для изучения количественных изменений гематоэнцефалического барьера пациентов с рассеянным склерозом или с опухолями. Изучение человека при помощи спектроскопии магнитного резонанса может помочь ускорять разработку лекарства, сокращая затраты и использование животных.

Методы подобные магнитному резонансу или магнитной энцефалографии – не альтернативы сами по себе, но они станут таковыми, если их использование позволит сократить эксперименты на животных, в то же время приблизив их к человеку.

Анализ простых форм поведения

Для регистрации и анализа поведенческих компонентов мышей и крыс используется система LABORAS (METRIS B.V., Netherlands). Система позволяет анализировать такие формы поведения, как движение, неподвижность, подъем на задние лапы, умывание, питье и принятие пищи, вращательное движение и построить гистограмму распределения. Кроме того, определяется скорость движения в различные периоды регистрации и пройденное расстояние за эксперимент. Также тест позволяет выяснить траекторию движения животного и предпочитаемое место в клетке, что часто применяется в таком тесте как «Открытое поле».

LABORAS основан на получении и анализе информации от специальной платформы, содержащей датчики вибрации и смещения вектора сил тяжести. Поступающая с платформы информация корректируется согласно массе животного, заданной экспериментатором. Преимущество LABORAS состоит в том, что измерения можно проводить в полной темноте. Длительность непрерывного измерения может составлять до 7 дней.

Система может применяться при изучении функций центральной нервной системы и поведения в процессе обучения, при лекарственной терапии, после хирургических процедур, изменения климата, при протекании аллергических реакций; LABORAS можно использовать для тестирования животных с генетическими модификациями.

Изучение вокализации животных в ультразвуковом диапазоне

SONOTRACK – метод анализа ультразвука, производимого лабораторными животными. Специальные микрофоны и оборудование позволяют регистрировать сигнал частотой от 20 до 100 кГц и записывать его в цифровом формате для дальнейшей обработки.

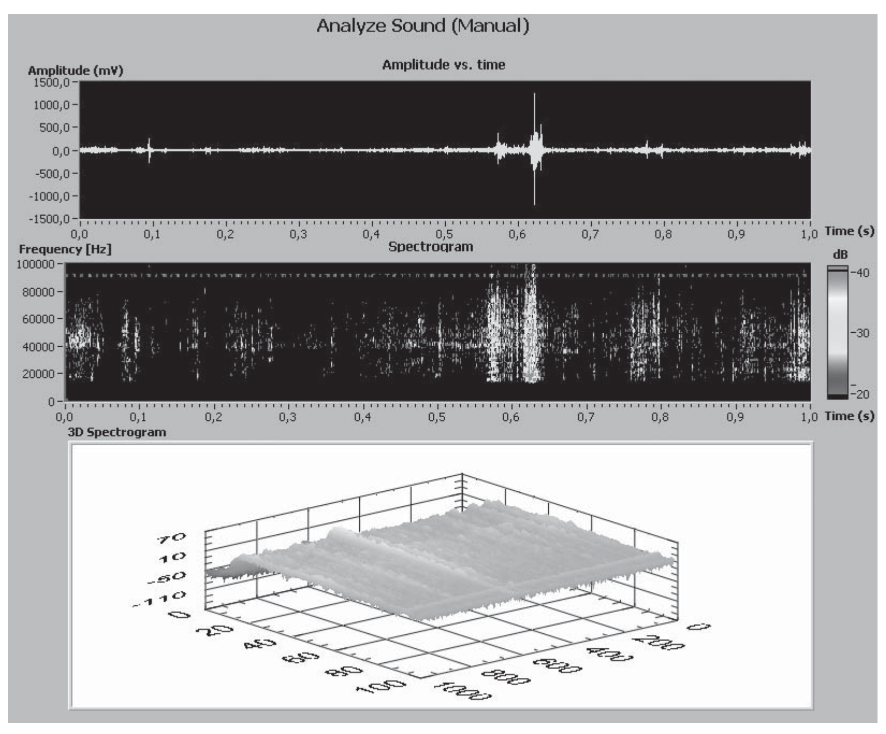


Рис. 43. Пример сонограммы одной эпохи анализа, записанной с помощью системы SONOTRACK (METRIS B.V., Netherlands)

Конверсионная методика, используемая SONOTRACK, основана на методе «расширения времени» и преобразования таким образом ультразвука в слышимые для человека частоты. Кроме того, метод позволяет определить к каждой эпохе анализа частоты, представленные в ультразвуке, продолжительность и амплитуду сигнала каждой частоты. Специальная программа представляет результаты эксперимента в трех видах:

– амплитуда общего сигнала, меняющаяся во времени;
– спектр частот записанного сигнала, во времени, цветом указывается амплитуда;
– сонограмма, что и в предыдущем случае, но в 3D графе (Рис. 43).

Поскольку высокочастотные колебания, не слышимые человеком, свидетельствуют об эмоциональных и мотивационных изменениях лабораторных животных, SONOTRACK может применяться для исследования благосостояния животного, обнаружения болевых ощущений, изменений при действии фармакологических веществ, также можно исследовать трансгенных животных.

Регистрация и анализ электрической активности мозга

Контроль функции центральной нервной системы осуществляется путем регистрации электроэнцефалограммы вертикальным биполярным методом (рис. 44, 45).

Спектральный анализ ЭЭГ проводится с помощью специальной компьютерной программы. Выделяются амплитуда и частота альфа- и бета-ритмов (рис. 46).

Функция внешнего дыхания, доставка кислорода тканям, а также тонус периферических сосудов оцениваются комбинированным исследованием – фотоплетизмографией и пульсоксиметрией, с оценкой среднего артериального давления оригинальным способом по показателям фотоплетизмограммы.

Вирусологические исследования

При необходимости подобные исследования выполняются в соответствии с Методическими указаниями по изучению специфической противовирусной активности новых фармакологических веществ (Ершов Ф.И. и др., 2005), в которых представлена сводка методов, используемых для исследования специфической противовирусной активности, показана необходимость комплексного изучения противовирусной активности на моделях *in vitro* и *in vivo*, определены критерии оценки и система оценки противовирусного действия химиопрепаратов в культуре клеток, под-



Рис. 44. Регистрация ЭЭГ с помощью программно-аппаратного комплекса внутрикожными электродами вертикальным биполярным способом у мини-свиней

робно разобраны особенности проведения испытаний противовирусного действия веществ при экспериментальных вирусных инфекциях на животных.

Биохимические исследования

При биохимическом анализе проводят оценку следующих параметров.

- ✓ АлАт (аланинаминотрансфераза).
- ✓ Холестерин общий.
- ✓ Триглицериды.
- ✓ Мочевина.
- ✓ Лактат (молочная кислота).
- ✓ Щелочная фосфотаза.
- ✓ АсАТ (Активность аспартатаминотрансфераза).
- ✓ Альбумин.
- ✓ Глюкоза.
- ✓ Общий белок.
- ✓ Панкреатическая альфа-амилаза.
- ✓ Альфа-амилаза.
- ✓ Активность креатинина.
- ✓ Общий и прямой билирубин.
- ✓ Мочевая кислота.



Рис. 45. Запись ЭЭГ крысы на электроэнцефалографе-анализаторе

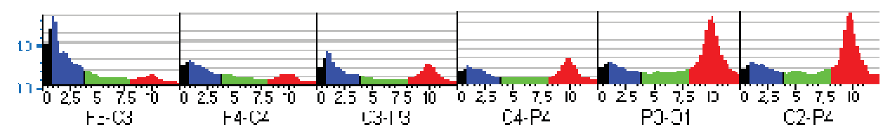


Рис. 46. Примеры спектрального анализа ЭЭГ (ось абсцисс – частота в Гц, ось ординат – амплитуда в мкВ)





Рис. 48. Тест на силу хватки



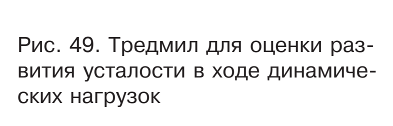


Рис. 49. Тредмил для оценки развития усталости в ходе динамических нагрузок



Рис. 50. Определение физической выносливости крысы на вращающемся валике



Рис. 51. Эксперимент по изучению острой гипобарической гипоксии крыс

В НЦБМТ РАМН исследования проводят с помощью автоматического анализатора Chemwell+.

Гематологические исследования

При проведении гематологических исследований определяют параметры:

✓ Гемоглобин.
✓ Эритроциты.
✓ Гематокрит.
✓ Средний объем эритроцитов.
✓ Среднее содержание гемоглобина в эритроците.
✓ Средняя концентрация гемоглобина в эритроците.
✓ Ширина распределения эритроцитов.
✓ Лейкоциты.
✓ Лимфоциты.
✓ Моноциты.
✓ Гранулоциты.
✓ Тромбоциты.

В НЦБМТ РАМН исследования проводят на анализаторе Granis 3 и Mindrey BC 3200.

Патоморфологические исследования

Собранные при некропсии ткани и органы должны быть подвергнуты гистологическому анализу.

Ткани, подлежащие гистологической обработке, очищаются, заливаются в парафин, нарезаются, окрашиваются гематоксилином и эозином и микроскопируются.

В конце эксперимента животные подвергаются эвтаназии помещением в CO_2-камеру и последующим обескровливанием.

При некропсии взвешиваются следующие органы: надпочечники, головной мозг, почки, придатки семенников, печень, легкие, сердце, селезенка, семенники/яичники, тимус.

Органы не взвешиваются у животных, найденных мертвыми. Парные органы взвешиваются вместе. Наряду с абсолютной массой органов будет рассчитано процентное отношение массы органа к массе тела животного.

У всех животных при некропсии берут костный мозг из бедренной кости аспирацией и делают мазки. Мазки высушивают, фиксируют, окрашивают и исследуют микроскопией для изучения клеточного состава, индекса созревания нейтрофилов и лейкоэритробластического соотношения.

Глава 12

Моделирование состояний организма при экстремальных и неблагоприятных воздействиях

Современные биомедицинские технологии широко используются в лечении пострадавших в техногенных и экологических катастрофах, а также в террористических актах и боевых действиях. Создание средств защиты и профилактики при таких воздействиях требуют использования и создания новых биомедицинских моделей. Экстраполяция полученных в эксперименте данных должна строиться на современных критериальных принципах оценки степени поражения различных органов и тканей человека при экстремальных или экологически неблагоприятных воздействиях.

Некоторые критерии оценки тяжести состояний человека и животных, а также методики проведения тестов измерения работоспособности, физической выносливости, применяемые в НЦБМТ РАМН, приведены в данной главе.

Системы оценки тяжести состояний человека и животных

В клинической медицине в настоящее время разработаны, доказали свою эффективность и широко применяются как методы изолированной оценки степени нарушений в различных системах (респираторный индекс, ренальный индекс, шкала ком Глазго), так и системы интегральной оценки тяжести состояния больных: индексы TISS, CHOP, APACHE, SAPS, SOFA, MODS.

Условно системы оценки тяжести состояния можно разделить на универсальные шкалы прогноза и риска летального исхода (APACHE, SAPS, ВПХ-СП, ВПХ-СГ) и шкалы оценки дисфункции органов и функциональных систем (SOFA, MODS, LODS).

Рекомендованными отечественными шкалами для количественной оценки тяжести состояния являются: «ВПХ-СП» и «ВПХ-СГ».

Шкала «ВПХ-СП» (С – состояние, П – поступление) позволяет оценивать тяжесть состояния при поступлении в лечебное учреждение, а шкала «ВПХ-СГ» (Г – госпитальная) – в процессе последующего лечения. При оценке тяжести состояния исследуются симптомы, перечисленные в шкалах, определяется значение каждого из них в баллах, после чего баллы суммируются. Полученный индекс является количественной характеристикой состояния в момент обследования, который затем соотносится с традиционными градациями тяжести состояния.

Разработан ряд адаптированных шкал, позволяющих экстраполировать полученные количественные значения тяжести состояния биообъектов на состояние человека. К таким шкалам относятся ВПХ-СП*био*, ВПХ-СГ*био*. Использование в экспериментах методик объективной оценки тяжести состояния биообъектов позволяет повысить валидность исследований.

Таблица 39

ШКАЛА ОБЪЕКТИВНОЙ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА (ВПХ-СП) И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ (ВПХ – СПБИО)

№ п/п	Оцениваемый параметр	Человек	Балл	Мини-свинья
1.	Кожный покров	Обычный	1	Обычный
		Синюшный	2	Синюшный
		Бледный	4	Бледный
		Серый	7	Серый
2.	Характер внешнего дыхания	Нормальное	1	Нормальное
		Частое (>25 в мин.)	5	Частое (>55 в мин.)
		Патологическое	8	Патологическое
3.	Аускультативные изменения в легких	Отчетливое дыхание	1	Отчетливое дыхание
		Ослабленное дыхание	3	Ослабленное дыхание
		Отсутствие дыхания	7	Отсутствие дыхания
4.	Речевой контакт	Нормальный	1	Есть вокализация
		Нарушен	3	–
		Отсутствует	6	–
5.	Реакция на боль	Сохранена	1	Сохранена
		Отсутствует	6	Отсутствует
6.	Зрачковый или роговичный рефлексы	Сохранен	1	Сохранен
		Отсутствует	8	Отсутствует

7.	Величина зрачков	Нормальные	1	Нормальные
		Узкие	2	Узкие
		Анизокория	4	Анизокория
		Широкие	6	Широкие
8.	Характер пульса	Нет аритмии	1	Нет аритмии
		Есть аритмия	8	Есть аритмия
9.	Частота пульса, уд./мин	60–80	1	70–90
		81–100	3	91–120
		101–140	4	121–140
		<60 или >140	7	<70 или >140
		Не определяется	9	Не определяется
10.	Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	101–130	1	101–130
		100-90 или >140	3	100–90 или >130
		70–89	4	70–89
		60–69	5	<70
		40–59	7	-
		<40	8	-
11.	Ориентировочная величина кровопотери, мл	<500	1	<500
		501–1000	3	501–1000
		1001–2000	4	1001–2000
		2001–3000	6	2001–3000
		>3001	9	>3001
12.	Шумы кишечной перистальтики	Отчетливые	1	Отчетливые
		Ослаблены	3	Ослаблены
		Отсутствуют	5	Отсутствуют

Таблица 40

АДАПТИРОВАННАЯ ШКАЛА ОБЪЕКТИВНОЙ ОЦЕНКИ ТЯЖЕСТИ СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА (ВПХ–СГБИО) С УЧЕТОМ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

№ п/п	Оцениваемый параметр	Человек	Балл	Мини-свинья
1.	Состояние сознания	ясное	1	ясное (реагирует на внешние раздражители)
		оглушение	3	
		сопор	6	сопор (заторможена)
		кома	8	-
		глубокая кома	9	глубокая кома (не реагирует на раздражители)
2.	Характер внешнего дыхания	нормальное	1	нормальное
		частое (>25 в мин.)	6	частое (>55 в мин.)
		патологическое	9	патологическое

№ п/п	Оцениваемый параметр	Человек	Балл	Мини-свинья
3.	Аускультативные изменения в легких	везикулярное дыхание	1	везикулярное дыхание
		ослабленное дыхание	3	ослабленное дыхание
		влажные хрипы	6	влажные хрипы
4.	Характер пульса	нет аритмии	1	нет аритмии
		есть аритмия	6	есть аритмия
5.	Частота пульса, уд. в мин.	60–80	1	70–90
		81–100	3	91–120
		101–140	5	121–140
		<60 или >140	7	<70 или>140
		не определяется	9	не определяется
6.	Систолическое артериальное давление, мм рт. ст.	>100	1	>110
		81–100	4	91–110
		61–80	8	71–90
		60 и <60	9	70 и <
7.	Шумы кишечной перистальтики	отчетливые	1	отчетливые
		ослабленные	3	ослабленные
		отсутствуют	5	отсутствуют
8.	Суточный диурез, мл	500–1500	1	1500–4000
		>1500	2	>4000
		<500	5	<1000
9.	Температура тела, °C	<37	1	<40
		37–38	2	40–42
		>38	3	>42 или <36
10.	Эритроциты крови, $\times 10^{12}$/л	>3,0	1	>5,0
		3,0–2,6	2	5,0–3,5
		2,5 и <2,5	4	3,5 и <3,5
11.	Лейкоциты крови, $\times 10^{9}$/л	8 и <8	1	20,0 и <20,0
		8,1–10,0	2	20,0–25,0
		10,1–15,0	3	25,0 и >
		>15,0	4	
12.	Палочкоядерные лейкоциты, %	<10	1	<10
		11–20	2	11–20
		>20	4	>20
13	Общий белок, г/л	>60	1	>60
		<60	3	<60
14	Азот мочевины, ммоль/л	>4,0	1	>8,3
		<4,0	3	<8,3
15	Эритроциты мочи, шт. в п. зр.	<10	1	<10
		>10	3	>10

№ п/п	Оцениваемый параметр	Человек	Балл	Мини-свинья
16	Белок мочи, %	нет белка	1	нет белка
		<0,03	2	<0,3
		>0,03	3	>0,3

В практической работе оценка тяжести состояния пациента производится многократно (не менее двух раз в сутки), значения индексов тяжести состояния регистрируются в реанимационной карте или в протоколах истории болезни, что является основой мониторинга. Аналогичным образом оценка тяжести состояний должна осуществляться, регистрироваться и фиксироваться в модельных экспериментах на животных. К таким тестам могут быть отнесены исследования статической и динамической выносливости, острой гипобарической гипоксии, уровня стрессируемости. Эти исследования должны проводиться с использованием методов оценки ЦНС, кардиососудистой системы, биохимического, гематологического и, при необходимости, патоморфологического анализов.

Оценка работоспособности человека и животных

Оценка физической работоспособности проводится с помощью специальных тестов. В последние десятилетия наибольшее распространение получили такие, как Гарвардский степ-тест и PWC-170. Помимо этих методик, в условиях реального производства используют оценку работоспособности по производственным показателям. Психофизиологические методы включают в себя исследование функций зрительного и слухового анализаторов, динамометрию, вариационную пульсометрию, применение тестов на внимание, память, мышление. Эти методы разнообразны, и их набор в каждом конкретном случае определяется условиями труда и задачами исследования.

В исследованиях на животных используются адекватные методы физических нагрузок на животных и принципы их оценки, описанные в предыдущих главах. Следует учитывать, что 1 моль АТФ дает 48 кДж энергии и что для ресинтеза 1 моля АТФ нужно 3 моля кислорода. При оценке «взрывных» нагрузок запасов O_2 в организме не хватает для немедленного ресинтеза АТФ. Такая работа обеспечивается за счет мобилизации энергии анаэробного распада креатинфосфата и гликогена. В итоге в организме накапливается много недоокисленных продуктов (молочной кислоты и др.). Создается кислородная задолженность.

С разной скоростью утомляются так называемые быстрые и медленные мышцы, имеющие разный тип энергетического обеспечения. Волокна быстрых фазных мышц, например портняжной мышцы лягушки или длинного разгибателя пальцев крысы, богаты гликогеном, но имеют мало митохондрий и практически не содержат миоглобина (аналог гемоглобина крови, депонирующий кислород). Они работают на энергетической основе анаэробного цикла реакций. Эти мышцы быстро утомляются. Волокна медленных мышц с одиночной иннервацией, генерирующих потенциалы действия, например, камбаловидной мышцы крысы, наоборот, бедны гликогеном, но богаты митохондриями и миоглобином, придающим им красный цвет. Эти мышцы при работе используют главным образом энергию аэробных реакций. Они особенно хорошо кровоснабжаются и могут работать долго без утомления. При небольшом энергетическом обеспечении (в них относительно мало гликогена и митохондрий) они могут долго работать. Утомление изолированных скелетных мышц, выражающееся в снижении их силы и далее в отказе от функции, имеет в качестве своей основной причины накопление в мышцах (внутри волокон и в межклеточных щелях) ряда продуктов метаболизма, прежде всего молочной кислоты (L-лактата), а также H_3PO_4. Эти вещества нарушают функции мышечных и нервных элементов и в особенности нервно-мышечную передачу. В свою очередь, накопление L-лактата (недоокисленного продукта) зависит от нехватки O_2. Что касается энергетических ресурсов мышцы (гликогена, креатинфосфата), то они при обычных условиях утомления не исчерпываются. Для оценки работоспособности животных используются разнообразные физиологические и биохимические методы, а также представленные в Руководстве методы измерения их физической выносливости.

Измерение физической выносливости животных при статических и динамических нагрузках

Для оценки физической выносливости проводятся контрольные и опытные замеры параметров силы, выносливости и тепловыделения при функциональных динамической и статической физических нагрузок (оценка эрготропного эффекта), которые могут включать тестирование высшей нервной деятельности животных (оценка психотропного эффекта), а также анализ крови на резистентность эритроцитов к кислотному гемолизу.

Использование теста на силу хватки необходимо для изучения нервно-мышечных функций у грызунов при статической нагрузке (рис. 48). Животное держат за хвост и позволяют ухватиться за металлическую решетку или треугольную рамку прибора, которую животное начинает тянуть на себя в горизонтальной плоскости. При этом прибор регистрирует

максимальную силу хватки (в граммах или ньютонах), развиваемую животным. Выход данных может производиться на принтер.

Для оценки развития усталости в ходе динамических нагрузок довольно часто используют беговую дорожку (Treadmill, можно использовать дорожку фирмы Panlab, Harvard Apparatus). Типичная беговая дорожка представляет собой ленту, движущуюся с задаваемой скоростью и наклоном (рис. 49). Максимальная скорость – 150 см/с. Животные принуждаются к бегу с помощью электрического шока через электрод, помещенный в нижнем конце дорожки. Прибор позволяет оценить общее расстояние пробега, число полученных электрических ударов и общее время ударов.

При тестировании фармакологических веществ изменение выносливости животных во время статических и динамических нагрузках говорит о моторной нейротоксичности.

Оценка физической выносливости в тесте «отчаяния»

Для оценки работоспособности и выносливости используется плавательный тест «отчаяния» по Porsolt и «Вынужденное плавание» с нагрузкой.

Тест «отчаяния» или вынужденного плавания отражает состояние депрессии животных. Тест принудительного плавания представляет собой комбинированный жесткий вид стресса, сочетающий физический и эмоциональный.

В эксперименте животных всех групп метят водоустойчивой краской и подвергают стрессу – плаванию в бассейне с грузом. Бассейн, как правило, представляет собой аквариум, сделанный из прочного прозрачного оргстекла и закрывающийся сверху сеткой. Уровень воды составляет минимум 30 см. Температура воды – 24°С. После плавания животные извлекаются из бассейна.

Скоростью развития утомления служит время плавания животного. Плавание осуществляется с грузом (свинцовый груз на резиновом кольце, прикрепляемый к корню хвоста), равным 7% от веса тела. Животные плавают с грузом до утомления, о котором свидетельствует погружение животного на дно цилиндра. В этот момент животное быстро извлекают из воды и обсушивают сухим полотенцем. Животные, длительность плавания которых при рандомизации отклоняется от среднего времени плавания на 35%, исключаются из эксперимента.

Особенности данной методики создают условия, в которых работоспособность животных в значительной мере зависит от обеспечения мышечной активности со стороны высшей нервной деятельности. Груз слишком велик, и животные плавают на пределе своих физических возможностей, что рождает у них паническое состояние.

Тест динамической выносливости

Процедура проходит в закрытой камере (30×30×40см) с отверстиями для воздухообмена. В течение эксперимента крыса передвигается на вращающемся валике, покрытым мягким, пористым материалом (диаметр валика 7 см, скорость вращения постепенно нарастает первые 5 минут с 6 до 12 об/мин). Валик поднят на высоту 15 см от пола. Пол камеры состоит из стальных стержней, на которые подается постоянное напряжение 25 В (ток 1 А без учета сопротивления кожи животных). При падении животного на пол микрофон, установленный под потолком камеры, регистрирует писк. В ходе эксперимента определяют общее время нахождения животного на валике и число падений с него.

Выносливость животного определяется скоростью его утомления, наступающего в результате непрерывного длительного передвижения по валику. Эксперимент завершается тогда, когда животное, упав с валика, больше не может запрыгнуть на него вновь, оставаясь лежать на полу (Рис. 50).

Моторная координация

Количественную оценку моторной координации проводят по следующей схеме. Предварительно животных обучают. Продолжительность обучения 3 дня, каждый день проводят 3 последовательные сессии. Сессия представляет собой следующую процедуру: животное помещают на стержень, вращающийся с постоянной скоростью (5 вращений в минуту), затем включают ускорение. Латентное время падения определяют как время, в течение которого животное балансирует на вращающемся стержне с момента включения ускорения до момента падения со стержня. По результатам обучения и предварительного тестирования животных отбирают в группы так, чтобы во всех группах были животные с однородными результатами.

Переносимость острой гипобарической гипоксии

Устойчивость к острой гипобарической гипоксии является информативным показателем адаптивных возможностей животных. Доказана прямая корреляция между типом нервной деятельности животных и потерями макроэргов, в том числе в мозговой ткани при острой гипоксии. Низкоустойчивые к гипоксии – это животные, преимущественно обладающие:

- ✓ слабым типом нервной системы;
- ✓ повышенной возбудимостью;

- ✓ повышенной эмоциональной реактивностью;
- ✓ менее развитым внутренним торможением;
- ✓ быстрой истощаемостью возбудительного процесса;
- ✓ судорожной готовностью, гораздо более выраженной, чем у высокоустойчивых;
- ✓ достоверно большей длительностью клонической фазы.

На гипоксическое воздействие они отвечают возбуждением и активацией двигательной реакции.

В отличие от этого для высокоустойчивых животных характерны:

- ✓ сниженная возбудимость;
- ✓ сниженная тревожность;
- v умеренная агрессивность;
- ✓ более выраженное внутреннее торможение;
- v малая чувствительность к любым провоцирующим воздействиям;
- ✓ склонность к социальному доминированию.

В НЦБМТ РАМН модифицирована методика оценки и контроля индивидуальной чувствительности к острой гипобарической гипоксии крыс по Л.Д. Лукьяновой. Для этого каждая крыса в барокамере «поднимается» на критическую высоту (11,5 тысяч метров) со скоростью 165 м/с, где она находится до предагонального состояния. Исследуется: ВПП – время первого падения (переход в лежачее положение), характеризующее порог реакции организма на это воздействие. ВЖ – время жизни «на высоте» до появления агонального дыхания, ВВП – время восстановления позы после «спуска» животного с «высоты». Меры оценки чувствительности животного к острой гипобарической гипоксии служит ВЖ «на высоте». К высокоустойчивым относятся те животные, которые выдерживают в барокамере острую гипобарическую гипоксию не менее 1200 с (ВЖ>1200 с). К низкоустойчивым относятся животные, выдерживающие острую гипобарическую гипоксию менее 150 с (ВЖ<150 с). Данный тест оптимизирован для оценки средств защитного действия и выносливости животного.

Тест резистентности к острой гипоксической гипоксии

В лечении гипоксических осложнений, возникающих при самой разнообразной патологии, действии экстремальных факторов, сверхвысоких физических и психоэмоциональных нагрузок, широко используются наряду с этиотропными средствами разные антиоксиданты (витамины Е, С, группы В и их производные, тиоловые соединения, полифенолы, ферментные препараты и др.). Предлагается также применение разнообразных комбинаций антиоксидантов и антигипоксантов в сочетании со средствами, влияющими на цикл Кребса (янтарная кислота, сукцинат и др.). Для оценки их действия используются различные модели гипоксии.

Дыхание из замкнутого пространства – респирация – является достаточно адекватной и простой моделью острой гипоксии. Животное, поглощая кислород из замкнутого пространства вследствие дыхания, испытывает развитие его дефицита – гипоксическую гипоксию, что позволяет оценивать исследуемый препарат по интегральным показателям летальности за определенное время наблюдения и устойчивости к дефициту кислорода (максимальной продолжительности жизни).

Животные помещаются в банку объемом 250 мл, плотно закрытую стеклянной крышкой, смазанную герметиком. Фиксируют с помощью секундомера максимальную продолжительность жизни и симптомы танатогенеза. Банки с животными во время исследования находятся в кондиционере, обеспечивающем постоянство условий эксперимента (температура +20°С, влажность – 65–70%, атмосферное давление.) Контролем служат интактные животные. Оцениваются показатели, характеризующие энергетический обмен, обмен липидов и антитоксическую активность организма.

Определение устойчивости животных (крысы, мыши, хомяки) к гипоксической гипоксии может быть выполнено в специальной камере, в которой создают необходимое разряжение (10000 м, 70 м/с). Рассчитывают время выживания (ВВ), время реституции (ВР) и соотношение ВВ:ВР как интегративный показатель резистентности. Проведения теста – сравнительное исследование антигипоксического действия фармакологических препаратов и их сочетаний, оцениваемое по индивидуальной чувствительности крыс.

Моделирование гипотермии

При моделировании гипотермии лучше использовать охлаждение в водной среде, чем на воздухе. При охлаждении в воде температурные показатели (ректальная, средневзвешенная температура кожи, средняя температура тела) ниже, чем при охлаждении на воздухе. При этом важно учитывать критерии допустимой переносимости в эксперименте, чтобы избежать развития патологических состоянии и постэкспериментальных осложнений у организма (Таблица 41). При таком охлаждении возникает мышечная дрожь, связанная с падением температуры «ядра», увеличивается частота сердечных сокращений.

Обоснованно использование в качестве модели охлаждения пребывание организма в водной среде при температуре 4—10°С в течение 3—15 минут, что позволяет экспериментально воспроизводить охлаждение 2-й степени, требующего применения средств обогрева с определением критериев теплового состояния.

Таблица 41

ПОКАЗАТЕЛИ ТЕПЛОВОГО СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА ДО И ПОСЛЕ ПЛАВАНИЯ В ВОДЕ ($T_{воды}$=10±3°С)

Показатели теплового состояния организма	Исходные данные				Сразу после выхода из воды			
	Человек	Собака	Мини-свинья	Крыса	Человек	Собака	Мини-свинья	Крыса
Температура тела (tт), °С	37,2	38,5	39,0	38,5	36,7	36,9	37,2	37,4
Средняя температура тела (tср), °С	34,6	35,0	36,2	34,8	30,3	31,3	33,1	30,5
Частота сердечных сокращений (ЧСС), уд/мин.	71	80	70	350	82	94	84	420
Артериальное давление (АД), мм рт. ст.	124/80	130/80	100/70	125/74	157/93	160/94	175/97	148/85

В сыворотке крови животных целесообразно определять высокий уровень малонового диальдегида, поскольку его содержание у человека в этих условиях увеличивается более чем в 1,2 раза, диеновых конъюгатов — в 2,9 раза. Изменения компонентов антиоксидантной системы человека проявляются в увеличении активности церулоплазмина в 2,1 раза, α-токоферола — в 1,1 раза.

В лейкоцитарной формуле человека отмечается увеличение соотношения сегментоядерных нейтрофилов, уменьшение числа миелоцитов, вплоть до отсутствия эозинофилов. Нарушается деятельность сердечно-сосудистой системы (вариабельность сердечного ритма, уменьшение длительности RR-интервала ЭКГ) и функции внешнего дыхания (снижение мощности спектра дыхательных волн).

При моделировании гипотермии необходимо изучение некоторых физиологических показателей: исследование функции внешнего дыхания, исследование функции нервной системы, расчет теплосодержания организма, измерение температуры тела в нескольких точках, определение ректальной температуры, оценка мышечного термогенеза, рефлексодиагностическое обследование.

Сопоставляя данные человека и животных физиологической и клинической картин охлаждения в воде, можно выделить следующие периоды: период устойчивой компенсации, период неполной компенсации, период декомпенсации и период необратимых или трудно обратимых изменений. Соответственно этим периодам охлаждения выделяют I, II, III и IV степени охлаждения.

Таблица 42

СТЕПЕНИ ОХЛАЖДЕНИЯ ОРГАНИЗМА У ЧЕЛОВЕКА И ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Степени охлаждения	Ректальная температура			
	Человек	Собака	Мини-свинья	Крыса
1 степень	37,0–36,5°С	38,0–37,5°С	38,4–37,4°С	37,1–36,8°С
2 степень	до 35,0°С	до 36,0°С	до 36,0°С	до 35,0°С
3 степень	до 30,0°С	до 31,0°С	до 30,0°С	до 29,0°С
4 степень	27,0–25,0°С	28,0–26,0°С	28,0–26,0°С	26,0–24,0°С

В целом, первая степень охлаждения характеризуется снижением температуры кожи на 10—15°С, усилением легочной вентиляции и потребления O_2, мышечной дрожью, повышением артериального давления и пульса. Температура тела (ректальная) изменяется немного (0,2—0,5°).

Вторая степень гипотермии, в отличие от первой, характеризуется достижением изменений вышеназванных показателей до максимального уровня, ослаблением рефлексов, снижением ректальной температуры на 1,5-2°С, увеличением легочной вентиляции в 5–6 раз, учащением пульса до 150 уд/мин, повышением артериального давления до 160/110 мм рт. ст., возбуждением ЦНС.

При третьей степени охлаждения происходит срыв приспособительных реакций организма: торможение мышечной дрожи, сменяющейся регидностью мышц, тормозными процессами в ЦНС, снижением окислительных процессов, брадикардией (30—40 уд/мин.), сохранением сознания, падением деятельности сердечно-сосудистой системы, сонливостью, понижением болевой чувствительности, галлюцинациями (бред, амнезия).

Четвертая степень охлаждения характеризуется патологическими сдвигами в организме: потеря сознания, расширение зрачков, полное прекращение мышечной дрожи, мерцание предсердий, фибрилляция желудочков сердца.

Уровень стрессируемости

Уровень стрессируемости животного оценивают с помощью специальных систем. Принцип их действия основан на количественном измерении давления, оказываемого животным на платформу с детекторами движения. При использовании неожиданных звуковых импульсов изменяется амплитуда так называемой «реакции испуга». Изменения проис-

ходят при вздрагивании животного от испуга в ответ на звуковое воздействия различной частоты, продолжительности и амплитуды.

Основными тестами являются: акустический (два или три коротких импульса), адаптационный (один импульс) и преимпульсное ингибирование (перед мощным импульсом дается более слабый предварительный импульс).

Типичная длительность преимпульса — 20 мс, импульса — 40 мс. В акустическом тесте обычно используют фоновый шум (65 dB). Громкость преимпульса, как правило, устанавливают выше фоновой на 3–12 dB, при этом акустические стимулы также обычно представляют собой белый шум.

Система позволяет устанавливать различную частоту импульса (0–10000 Гц), продолжительность (10–1000 мс) и амплитуду (0–120 dB). Также можно устанавливать необходимое число повторов эксперимента на одном животном, интервал между импульсами и порядок их активации.

Наиболее часто используют тест преимпульсное ингибирование (prepulse inhibition, PPI). Этот рефлекс испуга представляет собой снижение моторной реакции организма на сильный резкий стимул (импульс) при наличии слабого предварительного стимула (преимпульс). PPI является индикатором сенсоромоторной фильтрации, отражающим способность ЦНС фильтровать сенсорную информацию. PPI используется при изучении антипсихотических средств.

Оценка психической работоспособности

Психическую работоспособность животных можно оценивать по скорости нахождения ими выхода из двойного Т-образного лабиринта. У каждого животного измеряют время пробега лабиринта в двух направлениях: вперед (по часовой стрелке) и назад (против часовой стрелки). При этом время первичного пробега вперед считают показателем скорости ориентировочно-исследовательской реакции, а время последующего пробега того же пути назад оценивают как показатель кратковременной памяти. Все замеры проводят дважды: в первый и последний день испытаний, что исключает возможность обучения животных.

Поднятый крестообразный лабиринт – служит для оценки поведения у мелких лабораторных животных. Высокие борта закрытых рукавов лабиринта создают хорошую затемненность и значительно снижают число выпрыгивающих животных. Небольшой бортик открытых рукавов не дает животным упасть на пол в процессе эксперимента.

Интегральная оценка функционального состояния и поведения животных

Интегральная оценка поведения животных и их физиологических реакций возможна при сочетании различных адекватных и оптимизированных к конкретным задачам методов. В качестве примера можно представить используемую в НЦБМТ РАМН систему оценок функций высшей нервной деятельности (УРАИ и УРПИ), компьютерной электроэнцефалографии, многопараметрической оценки системного поведения животных (система LABORAS) и анализа «языка животных» с помощью компьютерного анализа ультразвуковой вокализации (система SONOTRACK, мыши, крысы).

Функциональное состояние животных при предельных нагрузках можно оценивать методом электроэнцефалографии. В критических случаях в зависимости от условий среды в биоэлектрической активности мозга может наблюдаться:

– судорожная активность, что часто выражается внешне в патологическом изменении тонуса скелетных мышц; амплитуда судорожных разрядов в ЭЭГ на порядок выше нормальной электрической активности мозга;
– генерализация по коре высокоамплитудного Δ-ритма в состоянии бодрствования животного;
– очень маленькая амплитуда колебаний в ЭЭГ, что может являться показателем коматозного состояния.

Информативно электроэнцефалографию применять не только при тестировании фармакологических веществ, но и при изучении влияния наноматериалов, которые предполагают широко использовать в медицине и технике в будущем. Так, в литературе существуют данные, в которых говорится о негативном влиянии на организм и, в частности, центральную нервную систему таких наночастиц, как фуллерены и их производных. Так, при интраперитонеальном введении крысам фторсодержащих производных фуллерена-60 эффект наблюдается уже через три минуты после инъекции и может сохраняться в течение часа, что отражается в изменении спектральной мощности и когерентности потенциалов ЭЭГ.

Предельные нагрузки ведут к стрессу и сильно изменяют вокализацию животных в ультразвуковом диапазоне, что можно зарегистрировать с помощью метода SONOTRACK. В этих условиях в сонограмме либо резко уменьшена доля ультразвука, либо регистрируется сигнал частотой 80–90 кГц.

Изменение поведения можно регистрировать системой LABORAS. В зависимости от условий среды может наблюдаться либо преимущественная иммобилизация, либо повышенная активность, например умывание, либо судорожная активность, либо циклическое кружение животного на месте. Остальные параметры могут быть оценены методами, описанными в главе «Сравнительная оценка динамики физиологических процессов».

Глава 13

Хирургические биомедицинские технологии

Изучение новых медицинских технологий, отработка новых операционных процедур и другие виды манипуляций могут проводиться на основе хирургических вмешательств.

Планирование операции

Планирование хирургической операции и все важные аспекты ее проведения обсуждаются исследователем с ветеринарным врачом. Используемые подходы и методы, оборудование, вспомогательный материал и опыт персонала должны быть адекватны планируемой хирургической операции.

В экспериментах используют здоровых конвенциональных или СПФ-животных. Ветврач проводит предоперационный осмотр животных. Этот осмотр может выявить потенциальные проблемы: анестезиологический риск. Больные животные должны быть выбракованы. Может потребоваться дополнительная терапия антибиотиками. Необходимо учесть необходимость дооперационной терапии антибиотиками. Техника проведения хирургической операции должна быть отработана заранее, возможно использование трупов животных. До операции используют обычную анальгезию для снижения чувствительности. После операции боль снижают дополнительной анальгезией.

Операция

Операционные процедуры проводят с использованием местной или общей анальгезии. Выбор анестетиков, анальгетиков или транквилизато-

ров осуществляют исходя из вида животного и цели эксперимента. Метаболизм лекарственных средств может привести к неожиданной смерти животных. Анестезию должен давать специалист, прошедший специальную подготовку.

Если на одном животном проводят несколько операций, промежуток времени между ними должен быть достаточным для восстановления сил.

Операции проводят в соответствии со всеми антисептическими требованиями. Требования включают подготовку операционного поля, использование стерильного инструмента, наличие стерильных хирургических халатов, масок, перчаток, шапочек. При соблюдении всех требований могут не понадобиться послеоперационные антибиотики.

Хирургический мониторинг

В протоколах-заявках на животных исследователь дает полную информацию о характере и технике проведения хирургической операции, включая описание предоперационной подготовки, анестезии, послеоперационного ухода, места проведения, указывает сотрудников, выполняющих каждую манипуляцию. Контроль за проведением хирургических операций осуществляет ветеринарный врач (специалист в области проводимых исследований с участием животных).

Квалификация персонала

Персонал допускается к проведению хирургических операций только после специального обучения и приобретения соответствующей квалификации.

Большие и малые операции

К большим хирургическим операциям относятся операции, выполняемые с проникновением в полости тела или вызывающие нарушение физических или физиологических функций организма. К малым хирургическим операциям относятся операции без проникновения в полости тела и не влияющие на функции организма, либо вызывающие незначительное и кратковременное их нарушение.

Операции могут подразделяться на приводящие и не приводящие к гибели животного. После операции, не приводящей к гибели животного, подразумевается восстановление животного после наркоза. Когда не планируется восстановление после операции, осуществляется эвтаназия животного до его возвращения в сознание.

Операции с использованием видеоэндохирургического комплекса

Активная разработка видеоэндохирургических технологий в современной хирургии открывает широкие перспективы для внедрения новых высокотехнологичных операций в экспериментальную хирургию с использованием крупных животных (мини-свиньи, телята) на органах грудной и брюшной полостей. Применение мини-инвазивных эндохирургических методик «без разреза» позволяет быстро адаптировать животное в послеоперационном периоде, соответствует гуманному подходу к проведению эксперимента.

Для выполнения видеохирургических операций необходима подготовка персонала, имеющая опыт дистанционной хирургии, соответствующий сертификат государственного образца. Операционная должна полностью соответствовать требованиям асептики и антисептики.

Помимо стандартного видеоэндохирургического отечественного комплекса, используемого в НЦБМТ РАМН, имеется несколько вариантов комплектации с учетом планируемых экспериментов, в частности гинекологический, урологический и расширенный.

Стерилизация инструментов осуществляется специальными антисептическими растворами.

Операционная бригада должна состоять из хирурга, ассистента и операционной сестры. Исследователи должны тщательно отработать ход операции и взаимодействие всей бригады до выполнения оперативного вмешательства. Вся операция или основные фрагменты записываются на видеокарту, что позволяет более тщательно подходить к анализу эксперимента. После операции исследователи подробно заполняют протокол операции, в котором должны быть отражены все выполняемые манипуляции, также возникшие осложнения и технические трудности.

В ближайшем послеоперационном периоде животное находится в специальном помещении под наблюдением хирурга для мониторинга состояния, диагностике возможных осложнений.

Методики хирургической техники с использованием видеоэндохирургического комплекса используются:

- ✓ в изучении возможности коррекции углеводного обмена, а также метаболических и иммунологических нарушений у экспериментального животного (мини-свиньи светлогорской породы) при сахарном диабете 2 типа и токсическом гепатите;
- ✓ в динамической биопсии для сравнительной патоморфологической характеристики результатов коррекции сахарного диабета и токсического гепатита при использовании гемопоэтических и стромальных клеток костного мозга от алло- и аутологичных доноров;
- ✓ для отработки техники забора донорского материала для технологии раздельного выделения из костного мозга гемопоэтических и стромальных стволовых клеток.

Видеоэндохирургическая прижизненная оценка динамики морфологических изменений внутренних органов животных

Методикой, позволяющей «гуманным», т.е. не выводя из эксперимента, способом оценить прижизненную динамику морфологических изменений внутренних органов в эксперименте с биообъектами в хроническом эксперименте является использование видеоторако- и лапароскопии.

Применение торакоскопической техники позволяет выявить изменения грудной стенки, наличие патологического содержимого в плевральной полости, субплевральные кровоизлияния, локализацию переломов ребер, а также наличие и степень распространенности изменений легких. Эти признаки далеко не всегда диагностируются с помощью рентгенографии и клинического обследования.

Лапароскопическая методика позволяет оценить переднюю брюшную стенку, полые и паренхиматозные органы, определить косвенные признаки изменений в органах, расположенных ретроперитонеально.

Видеоторако- и лапароскопия относятся к малоинвазивным методам хирургии, возможности которых распространяются как на крупных, так и на средних животных.

Данные вмешательства осуществляются в условиях операционной, с участием ветеринара и обязательным проведением общей анестезии.

Внедрение эндовидеохирургических методов в хроническом эксперименте на животных позволяет повысить точность диагностики изменений во внутренних органах, а также проследить динамику развития патологического процесса у конкретного животного в хроническом эксперименте, т.е. не выводя объект исследования из опыта.

Механические системы поддержки кровообращения и искусственные органы

Вспомогательное кровообращение является методом гемодинамической помощи сердцу при недостаточности его насосной функции с по-

мощью механических устройств чаще всего кровяных насосов, функционирующих параллельно с собственным сердцем больного.

Медико-техническая база методов вспомогательного кровообращения в настоящее время подвергалась значительным усовершенствованиям. Получили распространение совершенные насосы и системы управления. Обход левого желудочка сердца является оптимальным методом поддержания гемодинамики при ОСН, развившейся после операций на открытом сердце, когда ни интенсивная медикаментозная терапия, ни применение внутриаортальной контрпульсации не позволяют прекратить искусственное кровообращение.

Проблема полной и частичной замены жизненно важных органов искусственными затрагивает широкий круг вопросов как медицинского, так и медико-технического характера. К последнему направлению относятся методы временной помощи сердцу и замены его нагнетательной функции механическими устройствами, объединенные понятием «вспомогательное кровообращение». Накопленный на сегодняшний день многочисленный экспериментальный и клинический опыт показывает, что наиболее эффективным методом является обход сердца с помощью искусственных желудочков сердца.

Наиболее часто употребляемой биологической моделью для исследования системы кровообращения являются собаки. Это продиктовано сравнительно легкой доступностью этого экспериментального животного, большим накопленным опытом работы с собаками в хирургическом, анестезиологическом и гематологическом планах. Однако специфика работы устройств вспомогательного кровообращения требует выбора биологической модели, более сходной с человеком. В этом плане наиболее подходящим материалом являются телята, поскольку их анатомические и биологические особенности позволяют легко применять результаты экспериментальной части работы в клинической практике.

Эластические свойства крупных магистральных сосудов, физиологические параметры регуляции и работы миокарда, устойчивость крови к травме у телят имеют более высокие показатели, чем у собак. А главное, достаточный, сравнимый с человеческим размер сердца и плевральной полости позволили считать телят оптимальными биологическими моделями для апробации различных устройств вспомогательного кровообращения.

Методика проведения анестезии у телят имеет свои анатомо-физиологические особенности. После предварительной подготовки животные (телята) в течение суток не получали кормов и за 12 часов воду. Премедикация осуществлялась внутримышечным введением рампуна (обладающего седативным, обезболивающим, миорелаксирующим действием) из расчета 0,01 мг/кг 2% и 0,02 мг/кг 0,1% раствора атропина. Рампун является препаратом выбора для проведения премедикации и анестезии у крупных животных. Превышение допустимых доз, указанных выше, вызывает в послеоперационном периоде угнетение дыхания, и отрицательно влияет на гемодинамику. После наступления релаксации, необходимой для интубации животного (теленок ложился) при сохранении корнеальных рефлексов на фоне самостоятельного дыхания животное интубируется по методу Селтика и проводится искусственная вентиляция легких респиратором с частотой 18–20 в минуту, с дыхательным объемом 12–15 мл/кг массы, давление на вдохе не более 20 см вод.ст. Основной наркоз: фторотан 0,5–1,0 об.% с кислородом (40–60%). Глубина анестезии оценивается по корнеальным рефлексам, размерам зрачка, частоте сердечных сокращений и уровню артериального давления. В ходе операции вводятся миорелаксанты короткого действия (дитилин) в однократной дозе не более 200 мг на всю операцию. Профилактика нарушения ритма осуществляется за счет углубленной анестезии с одномоментным внутривенным введением лидокаина в дозе 80–160 мг (1–2 мг на 1 кг веса).

Острая сердечная недостаточность вызывается перевязкой ветвей левой коронарной артерии в средней трети. После первой перевязки у животных отмечается постепенное снижение артериального давления со 110–120 до 63–70 мм рт.ст. Необходимыми критериями сердечной недостаточности являются:

- ✓ неадекватный сердечный выброс и гипотония (АД <90 мм рт.ст.);
- ✓ неадекватное опорожнение полостей сердца;
- ✓ ухудшение расслабления сердца в диастолу;
- ✓ расширение сердечных камер;
- ✓ недостаточная перфузия тканей.

Эксперимент, в котором можно выделить и проследить все этапы вспомогательной перфузии, несмотря на все условности сравнения полученных при этом данных с клиническими, остается основным средством оценки влияния обхода левого желудочка сердца на организм. Несмотря на широкое распространение методов механической поддержки кровообращения в клинической практике, это отнюдь не означает, что сняты все вопросы, связанные с их применением. Наоборот, многие технические и медико-биологические задачи применения методов вспомогательного кровообращения все еще находятся в стадии разработки и изучения. Последние имеют особо большое значение для клинической практики, когда от эффективности обхода желудочков сердца зависит жизнь больного.

Асептические процедуры

Асептические хирургические операции проводятся в специально отведенных для этих целей комнатах с соблюдением правил асептики, использованием стерильного инструмента. Перед операцией поверхность стола обрабатывается дезинфектантом (0,5% раствор хлоргексидина-биглюконата на 70% этаноле).

Все хирургическое оборудование и материалы (инструмент, катетеры и т.п.) предварительно стерилизуются. Комната обрабатывается УФ. Руки моют и обрабатывают раствором антисептика «Декосепт» или 0,5% раствором хлоргексидина-биглюконата на 70% этаноле. Надеваются халат, лицевая маска и шапочка.

Для подготовки операционного поля удаляется шерсть, кожа животного обрабатывается дезинфектантом. Дезинфектант – «Декосепт» или 0,5% раствор хлоргексидина-биглюконата на 70% этаноле. При выполнении полостных операций хирургическое поле выделяется стерильными салфетками.

Разрезы зашиваются стерильным шовным материалом. После операции животные помещаются на стерильную подстилку.

Стерилизация инструментария и защитной одежды. Стерилизация хирургического инструментария осуществляется кипячением в стерилизаторе или автоклавированием. Быструю стерилизацию (при выполнении нескольких операций подряд) колющего и режущего инструмента проводят погружением в 0,5% раствор хлоргексидина-глюконата на 70% этаноле. Нестерильный шовный материал стерилизуют кипячением в стерилизаторе (синтетические нити) или погружением в раствор хлоргексидина-глюконата на 70% этаноле (хлопчатобумажные, льняные, смесовые нити и кетгут). Салфетки и перевязочный материал автоклавируются.

Постхирургические действия

После операции животные помещаются в индивидуальную клетку на стерильную подстилку. В клетку помещают корм, смоченный водой. Наблюдение ведется до пробуждения животного и принятия им нормальной физиологической позы. Для обогревания при выходе из наркоза применяются электролампы. В случае рекомендации ветеринарного врача могут применяться антибиотики и обезболивающие препараты, если они не будут мешать проведению исследования.

Операции с сохранением жизни

Оборудование для операций на животных с сохранением жизни. Операции с сохранением жизни на лабораторных животных проводятся в специально предназначенных для этого комнатах, оборудованных УФ-облучателями, ламинарными шкафами, столами и не используемых для выполнения других манипуляций. Имеются также специальные хирургические столики для фиксации животных и несколько наборов хирургических инструментов, необходимых и достаточных для проведения таких операций.

Меры, применяемые для предотвращения инфекций, включают использование стерильного инструмента и шовного материала, дезинфектантов для обработки операционного стола, рук хирурга и операционного поля у животного, изоляцию операционного поля стерильными салфетками, послеоперационной обработки ран. Во время проведения операций используется специальная одежда – халаты или хирургические костюмы, маски, шапочки.

Глава 14

Доклинические исследования эффективности и безопасности лекарственных средств и ксенобиотиков

Решение проблем обеспечения эффективности и безопасности лекарственных средств, унификации и стандартизации нормативной документации происходит на этапе доклинического исследования лекарственного средства, включающего изучение фармакологических, токсикологических и фармацевтических физико-химических свойств изучаемых веществ и/или их комбинаций и разработка и исследование готовых лекарственных форм.

Целью доклинических исследований лекарственных средств является получение научными методами оценок и доказательств эффективности и безопасности лекарственных средств. Их выбор, широта и глубина исследований определяется рекомендациями и требованиями соответствующего государственного (федерального) органа (Минздрав, Минздравмедпром, Минздравсоцразвития, Росздравнадзор и т.д.), отвечающего в соответствии с Конституцией страны за здоровье нации.

Для качественного проведения классических доклинических исследований новых медицинских лекарственных средств существует спектр необходимых и достаточных экспериментальных методов.

Гарантии эффективного и безопасного применения лекарственного средства обеспечивают *разработчик-производитель*, который должен выполнить действующие требования, и *уполномоченный государственный орган*, разрешающий новый препарат к применению. Доклинические исследования безопасности (общетоксическое действие и специфическая токсичность) потенциального ЛС проводятся *in vitro* и *in vivo* (на животных). При изучении общетоксического действия используют физиологические, фармакологические, биохимические, гематологические, патоморфологические и другие методы исследования. Исследования токсических эффектов на двух видах животных при однократном (острая токсичность) и повторном (1 нед., 1, 3 и 6 мес. — хроническая токсичность) введении необходимы для того, чтобы оценить действие препарата на центральную и вегетативную нервную систему, сердечно-сосудистую систему и на желудочно-кишечный тракт, на дыхательную, выделительную и эндокринную системы. Лекарственные средства, предназначенные для постоянного применения, исследуют более длительно. Исследования специфической токсичности включают в себя оценку потенциальных мутагенных, аллергизирующих, иммунотоксических, канцерогенных свойств, а также изучение репродуктивной токсичности.

Важной особенностью доклинических исследований лекарственных средств является то, что результаты исследований являются не только научной ценностью, но и лежат в основе решений, принимаемых государственными регулирующими органами по допуску лекарственных средств к клиническим исследованиям или медицинскому применению.

Место, время и достаточность животных в фармакотоксикологии

Количество используемых лабораторных животных следует ограничивать до минимума, необходимого и достаточного для достоверной оценки риска применения нового препарата. Программы исследований оригинальных, инновационных и воспроизведенных лекарственных средств различаются. Однако исследования на животных даже широко использующихся в медицинской практике лекарственных средств могут выявить их новые свойства, и риск использования препарата может быть снижен (повышен). Данная информация должна быть внесена в инструкцию по применению. Поскольку лекарственные средства являются особым видом товаров, оценка эффективности и безопасности (в большей степени безопасности) проводится на стадиях доклинических и клинических исследований и предрегистрационной доклинической и клинической экспертизы.

К экспериментальным животным для токсикологических исследований применяют здоровых половозрелых животных, прошедших карантин не менее 10—14 дней. Необходимо указать питомник, из которого получены животные. Неконтролируемыми питомниками пользоваться не следует.

У животных разных видов токсичность фармакологических веществ может сильно отличаться, поэтому необходимо проводить исследования на нескольких видах животных, причем наряду с грызунами обязательно

использовать негрызунов. Из грызунов наиболее удобны для токсикологических экспериментов мыши и крысы. Можно применять также кроликов, морских свинок, собак, а также мини-свиней и обезьян.

Токсикологические исследования можно проводить как на нелинейных, так и на линейных животных. В последнем случае следует указать линию (штамм, линия) животных, поскольку чувствительность к фармакологическому веществу может меняться и внутри вида в зависимости от линии.

Эксперименты проводят на животных обоего пола, учитывая полученные данные отдельно для самок и самцов.

Следует указать возраст животных, так как в зависимости от возраста может измениться фармакокинетика и, в связи с этим, – токсичность фармакологического вещества. Для того чтобы избежать большого разброса в исследуемых показателях, рекомендуется использовать животных одного возраста. Динамика массы тела животных зависит от многих факторов, в том числе и от исходной величины, поэтому разброс по исходной массе не должен превышать ±10%.

Содержание экспериментальных животных должно соответствовать действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). Следует учитывать, что чувствительность животных к фармакологическому веществу может изменяться под влиянием ряда внешних факторов (температура, влажность, освещенность и кратность воздухообмена помещения, состав подстилок, загрязненность помещения ксенобиотиками и др.).

Существенное действие на чувствительность животных к фармакологическому веществу может оказать состав пищи. Рекомендуется давать животным стандартную диету в соответствии с действующими нормами. Кормление и поение следует производить в фиксированное время, так как прием пищи может изменить чувствительность животных к фармакологическому веществу. В аналогичных условиях должны содержаться контрольные животные.

Действие фармакологического вещества может изменяться под влиянием ряда физиологических факторов. Кроме факторов, упомянутых выше, при проведении токсикологических исследований необходимо учитывать суточные и сезонные ритмы деятельности организма. В связи с этим рекомендуется вводить фармакологические вещества в фиксированное время суток и указывать время года, когда проводились эксперименты.

Фармакологические вещества, предназначенные для детей, следует дополнительно изучать на новорожденных и неполовозрелых растущих животных (по специальным методическим рекомендациям), а вещества для геронтологической практики дополнительно изучают на старых животных. Учитывая изменение реактивности организма при беременности,

фармакологические вещества, специально рекомендованные для беременных .женщин исследуют на животных в разные периоды беременности.

Обязательным является проведение токсикологических исследований на здоровых животных, хотя наличие патологии может изменить чувствительность животных и позволяет в ряде случаев получить дополнительную информацию о токсичности фармакологического вещества. Однако широкое использование животных с искусственными, спонтанными или генетическими заболеваниями в настоящее время не может быть рекомендовано при токсикологических исследованиях, поскольку ценность данных, полученных в таких условиях эксперимента, требует дальнейшего изучения и подтверждения.

При оценке эффективности фармвеществ число животных в каждой группе должно быть достаточным для того, чтобы оценить характер и частоту проявления токсических эффектов и позволить подвергнуть результаты опытов статистической обработке. Вместе с тем статистический анализ не должен маскировать случайные биологические наблюдения, если даже они статистически недостоверны.

Острую токсичность следует изучать на нескольких видах животных, причем обязательно использовать тот вид, на котором был показан терапевтический эффект фармакологического вещества и на котором будет исследована токсичность при длительном введении. Обычно используют 2–3 вида грызунов и негрызунов (мыши, крысы, морские свинки, кролики или др.). Группы самцов и самок подопытных животных формируют отдельно. Для мелких грызунов каждая группа должна содержать не менее 5–6 самок и такое же количество самцов.

Количество собак, мини-свиней или обезьян в группе может быть 3–5. Общее количество мелких грызунов, использованных в опыте, должно обеспечить возможность вычисления $ЛД_{50}$. Если из-за низкой токсичности фармакологического вещества нельзя определить $ЛД_{50}$, следует указать максимальную дозу, которая была введена животным.

Хроническую токсичность изучают не менее чем на 2-х видах животных. Желательно использовать животных, на которых был получен терапевтический эффект. Обычно хронические эксперименты проводят на крысах, кроликах, морских свинках и собаках.

Если воспроизведенное фармакологическое вещество исследуют параллельно с его оригинальным фирменным аналогом (стандартное лекарственное вещество), изучение хронической токсичности можно ограничить экспериментами на грызунах (крысах, кроликах и др.). Группы подопытных животных формируют отдельно из самок и самцов. Группы мелких лабораторных животных должны содержать не менее 10 особей, крупных животных – не менее 4-х.

Об оценке эффективности лекарственных средств

Доклинические **фармакологические** исследования включают в себя изучение **фармакокинетики** (изучение пути поступления, распределения и метаболизма лекарственных веществ в организме, а также их выведение), **фармакодинамики** (изучение совокупности эффектов, вызываемых лекарственным веществом, а также механизмы его действия).

Исследования подразделяются на изучение общей (влияние на центральную нервную систему, сердечно-сосудистую систему и др.) и специфической фармакологической (терапевтической) активности лекарственного средства, например активность при экспериментальной патологии, лиганд-рецепторное взаимодействие и специфичность действия.

К фармакологическим исследованиям относятся также и исследования по оценке безопасности (например, специальные исследования для изучения иных, не имеющих терапевтической направленности, фармакологических эффектов).

Изучение фармакологических свойств лекарственного средства складывается из следующих основных этапов: изучение общего действия фармакологического вещества на интактных лабораторных животных, исследование токсического действия фармакологического вещества и характера изменений, приводящих к гибели животных, избирательного исследования фармакологической активности, базирующегося на данных, полученных в ходе изучения общего действия и токсичности фармакологического вещества, проведения специальных тестов для выявления активности, не обнаруживаемой при изучении острой токсичности и общем скрининге. Эти этапы первичного фармакологического исследования составляют начальную стадию изыскания и изучения новых лекарственных веществ. Оценка общего действия фармакологических веществ осуществляется по данным поведенческих реакций, нервно-мышечной возбудимости, вегетативным эффектам и др. (Гацура В.В., 1974).

В качестве примера научно-методического подхода к экспериментальному изучению эффективности лекарственных средств можно привести стратегию доклинического изучения антибиотиков и синтетических антибактериальных препаратов. Так, целью методического документа является унификация исследований по оценке спектра антимикробной активности и химиотерапевтического действия с использованием комплекса стандартных методов. По результатам исследования должна быть установлена активность нового препарата в отношении определенных групп возбудителей, рекомендованы показания к применению, ориентировочные режимы лечения на период клинических испытаний.

Принципы, порядок и технологии проведения фармакологических и токсикологических исследований на лабораторных животных

Руководитель и ответственный исполнитель работы перед ее началом составляют протокол, включающий полную информацию о целях и задачах исследования, сроках его проведения, экспериментальных моделях, регистрируемых показателях, методах статистической обработки и расчетов относительных показателей. Протокол экспериментальных исследований подписывают руководитель и ответственный исполнитель работы, утверждает руководитель учреждения, своей подписью удостоверяющий правильность определения объема материалов и методов исследования, а также соблюдение правил работы с животными при выборе количества экспериментальных моделей и количества животных в группах.

Подготовка животных к опыту и организация эксперимента

В подготовительный период постановки токсикологического (фармакологического) эксперимента производится подбор и подготовка животных, прошедших карантин и клиническое обследование. Продолжительность периода определяется задачами исследования, выбором объекта научного эксперимента, обстановкой, в которой будут проводиться опыты, и другими условиями. В течение этого периода животных следует приручать к исследователю и проведению простейших манипуляций.

Исходный период постановки эксперимента условно подразделяют на этапы:

- ✓ подбор требующихся по условиям опыта животных;
- ✓ наблюдение (карантин) и выбраковка животных;
- ✓ определение исходных величин исследуемых показателей (фон);
- ✓ выбраковка животных с ярко выделяющимися величинами исследованных (фоновых) показателей;
- ✓ распределение животных по группам;
- ✓ статистическая проверка отсутствия межгрупповых различий.

В опытах используют грызунов, зайцеобразных, копытных и приматов, полученных только из специализированных питомников и прошедших карантин не менее:

- ✓ для крыс и мышей — 10 суток;
- ✓ для морских свинок и кроликов — 21 суток;
- ✓ для собак и мини-свиней — 30 суток.

При распределении животных по группам соблюдается принцип однородности по ряду показателей (генетическая однородность, пол, возраст, масса тела и пр.). Распределение животных на опытные и контрольные группы осуществляется произвольно.

Таблица 43

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ВИДОВАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НЕКОТОРЫХ АНАТОМО-ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ

Показатель	Вид животного				
	Мыши	Крысы	Морские свинки	Кролики	Кошки
Продолжительность жизни, лет	1,5-2 1,5-3	2-2,5 3	6-8 7	4-9 4-9	10-12 10-15
Масса половозрелого животного, г	15-18	120-150	250-300	В зависимости от породы	
Масса взрослого животного, кг	0,02 0,02	0,25 0,2	0,8-1,0 0,4	То же 2,5	3,0
Поверхность тела, м^2	0,006	0,030	0,048	0,18	0,20
Отношение поверхности тела к массе, м^2/кг	0,3	0,15	0,12	0,072	0,066
Объем тела, л	-	0,264	0,527	3,16	-

Таблица 44

МАССА ТЕЛА ЖИВОТНЫХ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Вид животного	Масса тела, кг
Белые мыши	0,018…0,024;
Белые крысы	0,18…0,30;
Морские свинки	0,38…0,62;
Кролики	1,80…3,40;
Кошки	2,00…4,00;
Собаки	6,00…17,00;
Свиньи	20,0…45,0;
Овцы	25,0…45,0;
Обезьяны (макаки бурые, макаки резус, макаки лапундер, павианы, гамадрилы)	4,0…40,0;

Показателем возраста животных служит их вес (Таблица 43).

В опытах используются клинически здоровые животные обоего пола в равном соотношении, с массой тела, указанной в Таблице 44.

Масса тела подопытных животных определяется с погрешностью взвешивания не более ±1%. Отклонения массы тела животных в пределах одной экспериментальной группы не должны превышать 10% от средней величины.

Выбор определенного вида или нескольких видов животных для использования в эксперименте определяется целью и задачами конкретного токсикологического (фармакологического) исследования.

Условия и порядок проведения токсикологических (фармакологических) исследований

Эксперименты по определению параметров токсичности биологически активных химических соединений, эффективности антидотов на животных проводятся в лабораторных условиях при температуре воздуха + 18...24°С, относительной влажности воздуха 60–75% и скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0–1,5 м/с.

Рекомендуемое количество животных на дозовую точку при исследовании острой токсичности составляет: для грызунов и зайцеобразных – от 6 до 12 особей каждого пола; для кошек, собак и других крупных животных – не менее 4 особей каждого пола; для обезьян – не менее 2 особей каждого пола. При исследовании подострой токсичности образцов биологически активных химических соединений используют животных не менее трех видов, один из которых не относится к отрядам грызунов и зайцеобразных.

В зависимости от цели и задач исследования количество животных в экспериментальных группах может варьировать в соответствии с решением руководителя и ответственного исполнителя работы.

Образцы биологически активных химических соединений в установленной паспортом вещества форме (раствор, эмульсия, аэрозоль, пар и др.) вводят животным путем, обеспечивающим наиболее точное определение введенной дозы (внутривенный или внутримышечный – для крупных лабораторных животных; внутривенный, внутримышечный или внутрибрюшинный – для грызунов). В зависимости от задач исследования используют также подкожный, перкутанный (накожный), пероральный, ингаляционный виды аппликации.

Внутривенное (внутримышечное) введение растворов вещества подопытным животным осуществляется в удельном объеме (мг/кг): белым мышам – 5,0; белым крысам и морским свинкам – 0,5; кроликам, собакам, свиньям, овцам, обезьянам – 0,05; крупному рогатому скоту – 0,005.

Значения максимально допустимого количества жидкости для наиболее часто используемых в эксперименте видов лабораторных животных с учетом пути поступления в организм приведены в Таблице 45.

Таблица 45

МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМЫЕ КОЛИЧЕСТВА ЖИДКОСТИ (МЛ) ДЛЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПУТИ ВВЕДЕНИЯ

Вид животного	Вес, г	Пути введения				
		В желудок	Под кожу	В/м	В/в	В/б
Мышь	20–24 25–30 >30	0,5 0,8 1,0	1,0	0,5	0,2-0,5	1,0
Крыса	100–190 200–240 250–300 >300	3,0 4,0-5,0 6,0 8,0	10,5	5,0	2,0	5,0
Морская свинка	250–300 >300	4,0-5,0 6,0	15,0	5,0	5,0-8,0	5,0

Кролик	2000–2400 2500–3000 >3000	100,0 150,0 200,0	30,0	15,0	20,0	20,0–30,0

При исследовании острой токсичности образцов биологически активных химических соединений наблюдение за животными осуществляют в течение 6 часов непрерывно, затем – периодически, не менее чем в течение 3-х суток. Сроки наблюдения могут быть увеличены в зависимости от особенностей механизмов действия исследуемых веществ и конкретных целей задач исследования.

При исследовании подострой токсичности образцов биологически активных химических соединений продолжительность наблюдения составляет 28 суток.

В период непрерывного наблюдения у подопытных животных с точностью до минуты регистрируется время проявления основных симптомов интоксикации. После окончания срока наблюдения группы подопытных животных расформировываются. Выживших животных по окончании эксперимента, как правило, подвергают эвтаназии.

Оцениваемыми токсикометрическими показателями биологически активных химических соединений являются:

– медианно эффективные (ED_{50}), минимально эффективные (ED_5) и максимально эффективные (ED_{95}) дозы, вызывающие регистрируемый целевой токсический эффект у подопытных животных при конкретном виде аппликации;
– быстродействие (Δt^s) – время проявления регистрируемого целевого эффекта при воздействии биологически активных химических соединений в медианно-эффективной дозе, выраженное в минутах (часах).

При регистрации гибели животных во время испытания подострой токсичности рассчитывают индекс кумуляции – отношение величины медианно-смертельной дозы (LD_{50}) при однократном введении к суммарной величине LD_{50} при повторных введениях.

Расчет медианно-эффективных доз (токсодоз) образцов исследуемого вещества для грызунов и зайцеобразных выполняют методом пробит-анализа. Для собак и других крупных животных допустимо применение экспресс-методов.

Для характеристики безопасности применения образцов биологически активных химических соединений рассчитывают широту токсического действия (ШТД) в соответствии с формулой (1):

$$ШТД = \frac{LD_{50}}{ED_{50}} \qquad (1)$$

и индекс Брокка–Шнайдера в соответствии с формулой (2):

$$I_{БШ} = \frac{LD_{10}}{ED_{90}}. \qquad (2)$$

В ходе наблюдения за подопытными животными после воздействия изучаемых образцов биологически активных химических соединений определяют параметры зависимости «доза–время–эффект», регистрируют продолжительность целевого эффекта и клинические особенности проявления токсического процесса.

Исследование специфической активности биологически активных химических соединений проводят с использованием комплекса методик, позволяющих всесторонне оценить выраженность, скорость формирования и продолжительность целевого эффекта в зависимости от дозы (токсодозы) введенного вещества, а также соотнести уровни различных категорий токсодоз. Перечень применяемых методик определяется исходя из необходимости оценки характера и выраженности целевого эффекта.

Все павшие в течение периода наблюдения животные подлежат вскрытию с морфогистологическим описанием изменений состояния внутренних органов.

При оценке специфической активности антидотов регистрируются и рассчитываются следующие показатели:

✓ коэффициент защиты – отношение медианно эффективной дозы химического соединения по целевому эффекту без применения антидота к медианно эффективной дозе на фоне применения антидота;
✓ антидотная мощность – отношение максимально эффективной дозы химического соединений по целевому эффекту без применения антидота к медианно эффективной дозе на фоне применения антидота;
✓ индекс гарантированной защиты – отношение количества максимально-эффективных доз химического соединения по целевому эффекту без применения антидота к минимально-эффективной дозе на фоне применения антидота.

Наряду с выраженностью специфической активности антидотов оценивают:

✓ время наступления защитного эффекта и его продолжительность;
✓ спектр антидотной эффективности (универсальность), характеризующий групповую специфичность антидота;
✓ полноту защитного действия, характеризующую способность антидота купировать максимальное количество морфофункциональных изменений при интоксикациях.

При исследовании фармакокинетики образцов биологически активных химических соединений у животных отбирают пробы биоматериала

в сроки, позволяющие фиксировать: не менее трех точек, приходящихся на фазу нарастания концентрации; не менее трех точек, описывающих пик концентрации; не менее пяти точек, характеризующих фазу снижения концентрации исследуемого вещества вплоть до регистрации следовых количеств. На основании экспериментального материала рассчитывают следующие показатели:

b – постоянная убывания на хвосте распределения (мин);
C_{max} – максимальная концентрация (мкг/мл);
AUC – полная площадь под кривой (мин мкг/мл);
C_{max}/AUC – скорость всасывания ($мин^{-1}$);
MRT – среднее время удерживания (мин);
Vo – центральный объем распределения (мл/кг);
Cl – общий клиренс (мл/мин/кг);
V – стационарный объем распределения (мл/кг);
$T_{эфф}$ – эффективная длительность процесса (мин).

Протокол эксперимента. Все результаты экспериментов протоколируют в соответствии с требованиями Приказа Министра здравоохранения РФ от 19 июня 2003 года № 267.

Параметры безопасности лекарств

Установление характера и выраженности повреждающего действия фармакологического вещества на организм экспериментальных животных служит мерой оценки его безопасности.

Токсичность – свойство или способность химических веществ, действуя на биологические системы немеханическим путем, вызывать их повреждение или гибель, или токсичность – свойство лекарственного средства вызывать нежелаемые биологические эффекты в дозах, больших, чем лечебные, или, другими словами, токсичность – свойство вещества при попадании в определенных количествах в организм человека, животных или растений вызывать их отравление или гибель.

В основу суждения о токсичности вещества для человека (при отсутствии точных клинических данных) положены результаты опытов на животных, разнообразие и число которых в отдельных случаях должно быть увеличено.

Развитие химико-фармацевтической промышленности последних десятилетий привело к созданию большого количества новых высокоэффективных лекарственных средств. Это существенно расширило возможности лечения различных заболеваний и создало предпосылки резкого

увеличения числа **нежелательных побочных эффектов** на лекарственные препараты при их широком медицинском применении.

Большинство нежелательных побочных эффектов лекарственных препаратов выявляется при их доклиническом токсикологическом изучении в эксперименте на лабораторных животных. В связи с чем в последние годы резко возросла роль доклинического изучения безопасности разрабатываемых препаратов. Токсикологические исследования существенно расширились, стали сложными и дорогостоящими; их объем, адекватность используемых методов и биологических моделей, а также качество проводимых исследований строго регламентируется и контролируется органами здравоохранения большинства стран.

Общепринятым является разделение токсикологических исследований на изучение **общетоксического действия** и исследование специфических видов токсичности (аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность, канцерогенность).

Изучение общетоксического действия позволяет определить переносимые и токсические дозы фармакологического вещества и выявить наиболее чувствительные к изучаемому фармакологическому веществу органы и системы организма, характер и степень патологических изменений в них, а также исследовать обратимость вызываемых повреждений.

Исследование общетоксического действия подразделяется на изучение **острой токсичности** (токсическое действие вещества, введенного в однократной дозе или в многократных дозах в течение не более 24 часов, которое может выражаться в расстройстве физиологических функций или в нарушении морфологии органов экспериментальных животных, а также гибели животного), **подострой/субхронической токсичности** (совокупность функциональных и/или морфологических нарушений органов и систем подопытного животного после повторного введения в течение 2–12 недель) и **хронической токсичности** (совокупность функциональных или/или морфологических нарушений органов и систем подопытного животного после повторного введения в течение 3–6–12–18 месяцев). Продолжительность введения лекарственного средства при изучении хронической токсичности определяется предполагаемым курсом клинического применения.

В качестве классического примера проведения доклинических исследований лекарственных средств можно привести методологические подходы к изучению общей токсичности изложенные в Методических рекомендациях по изучению общетоксического действия фармакологических веществ (Арзамасцев Е.В. и др., 2005).

Технология оценки безопасности субстанций и лекарств

Токсикологические исследования обязательны как для субстанции, так и для всех лекарственных форм фармакологического вещества. При проведении исследования субстанции в полном объеме изучения лекарственной формы вещества может быть сокращено. Если лекарственная форма содержит вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т.п.), неразрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из этих веществ исследуют отдельно. При комбинации нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают токсичность комбинации в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

При изменении соотношения ингредиентов в комбинированной лекарственной форме или увеличении дозировки для решения вопроса о необходимости проведения токсикологических исследований следует провести переоценку новой комбинации с точки зрения безопасности ее применения.

Необходимо проведение токсикологических исследований воспроизведенных препаратов (дженериков) в следующих случаях:

- ✓ препараты, не имеющие разрешения к медицинскому применению в стране-производителе и отличающиеся по составу лекарственной формы от аналогичных зарегистрированных в России;
- ✓ препараты, не отличающиеся по составу лекарственной формы, но содержащие ингредиенты нефармакопейного качества или с изменением состава оболочки;
- ✓ препараты, полученные на основе биотехнологии (в любых случаях).

Минимальный объем токсикологических исследований дженериков должен включать:

- ✓ сравнительное изучение острой токсичности на грызунах при том способе введения, который указан в инструкции по применению препарата;
- ✓ сравнительное изучение субхронической токсичности на животных (крысы, кролики, собаки или др.) при введении препарата не менее 2-х недель, при способе применения, указанном в инструкции, в дозах, вызывающих токсический эффект, с обязательным гистологическим исследованием внутренних органов и области введения препарата.

Подготовка проектов ВФС и ФСП

Характеристика субстанций и лекарств. Для проведения токсикологического изучения необходимо иметь характеристику субстанции (предварительную нормативную документацию; проект ВФС) фармакологического вещества, согласно которой оно идентифицируется, устанавливаются пределы содержания примесей, определяется его стабильность. Дается также характеристика (проект ФСП) лекарственной формы и вспомогательных веществ, использованных при ее получении (растворители, наполнители, стабилизаторы и др.). Если характеристика фармакологического вещества меняется, например, в результате модификации способа получения субстанции или лекарственной формы, следует оценить влияние этого изменения в связи с данными, полученными при токсикологическом изучении исходного фармакологического вещества.

Физико-химические свойства. Следует иметь данные о растворимости, гидрофобности или липофильности фармакологического вещества, размере и форме кристаллов. Если по условиям эксперимента субстанцию исследуют в виде раствора или взвеси с использованием ингредиентов, не указанных в соответствующих лекарственных формах фармакологического вещества, необходимо привести характеристику этих ингредиентов и данные о стабильности используемого раствора. При исследовании хронической токсичности применение дополнительных растворителей не рекомендуется.

Терапевтическая активность. Для проведения токсикологических исследований должны быть представлены данные, характеризующие терапевтическую активность фармакологического вещества в эксперименте на животных с указанием вида животных, использованных моделей, доз и путей введения. Следует также указать предполагаемые направления клинического изучения фармакологического вещества, рекомендуемые дозы, способы и длительность применения.

Острая токсичность – вредное действие препарата, проявляющееся после его однократного применения или повторного введения через короткие (не более 6 часов) интервалы в течение суток.

Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных.

Основные параметры острой токсичности лекарственного средства могут быть вычислены с помощью любых статистических методов, однако предпочтительнее пользоваться методами, позволяющими провести сравнительную оценку исследованных параметров для 2 или более фар-

макологических веществ, например, методом Литчфилда и Уилкоксона. Использованный метод должен быть обязательно указан в отчете.

Пути введения. У мелких лабораторных животных токсичность фармакологического вещества обычно исследуют при нескольких путях введения, причем обязательно использовать тот путь, при котором была показана терапевтическая активность фармакологического вещества, и путь, который предполагается для клинического изучения. Фармакологические вещества, предназначенные для системного введения, вводят внутрь и парентерально (внутрибрюшинно, если они нерастворимы в воде, внутривенно и подкожно, если они растворимы). Следует учитывать, что при определении токсичности имеют значение концентрация и объем вводимого фармакологического вещества, а при внутривенных инъекциях также скорость введения. Фармакологические вещества, предлагаемые для местного применения, наносят или вводят в соответствующую область согласно способу, предлагаемому для клиники. Кроме того, дополнительно изучают их токсичность при системном применении.

Фармакологические вещества, предлагаемые для приема внутрь, следует вводить через зонд, закладывать на корень языка, исключение могут составить полимеры, которые можно давать с пищей.

Фармакологические вещества, рекомендованные для ингаляции, изучают, помещая мелких лабораторных животных в затравочные камеры, снабженные специальными затравочными устройствами.

Оценка параметров токсичности. При разных путях введения могут быть получены ориентировочные данные о скорости и степени всасывания фармакологического вещества, а сопоставление прямых, отражающих зависимость величины токсического эффекта от дозы, позволяет судить о сходстве или различии в механизмах, вызывающих летальный исход при разных путях введения.

Контроль состояния животных. Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности должна составлять не менее 2-х недель, причем в первый день после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением.

Регулярно фиксируют общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координации движений, тонус скелетных мышц, реакции на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние волосяного и кожного покрова, окраску слизистых оболочек, размер зрачка, положение хвоста, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и окраску мочи, потребление корма и воды, изменение массы тела и другие показатели, которые могут быть использованы для выявления токсического эффекта. Для отдельных фармакологических веществ целесообразно исследовать некоторые гематологические показатели (морфологические, биохимические, свертываемость крови).

Весьма существенным является регистрация сроков развития интоксикации и гибели животных. Целесообразно проводить макроскопическое исследование внутренних органов погибших животных, а в случае отсроченной гибели животных, и микроскопическое исследование (степень кровенаполнения органов, наличие кровоизлияний, изъязвлений слизистых оболочек и др.).

Результаты следует представлять в таблице (Таблица 49).

Таблица 49

КОНТРОЛЬ СОСТОЯНИЯ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ФАРМПРЕПАРАТА

Вид животных	Пол	Дозы, мг/кг	Число погибших животных	$ЛД_{10}$	$ЛД_{16}$	$ЛД_{50}$ (с доверительными границами)	$ЛД_{84}$

Исследование кумуляции. При выборе доз для исследования хронической токсичности фармакологического вещества следует учитывать его кумулятивное действие. Поэтому до проведения хронических токсикологических экспериментов рекомендуется определить индекс кумуляции фармакологического вещества, т. е. отношение $ЛД_{50}$ при однократном введении к $ЛД_{50}$ при кратном введении. Для этой цели можно использовать различные методы, основанные на учете гибели животных при повторном введении фармакологического вещества.

Предпочтение следует отдать изучению кумуляции методом Lim'а с соавторами, позволяющим оценить не только кумулятивные свойства, но и привыкание (Таблица 50).

Схема изучения кумуляции методом субхронической токсичности по Lim'у с соавторами следующая.

Таблица 50

СХЕМА ИЗУЧЕНИЯ КУМУЛЯЦИИ МЕТОДОМ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПО LIM'У С СОАВТОРАМИ

Дни введения	Число животных (n=10)	Доля от $ЛД_{50}$
1–4		0,1
5–8		0,15
9–12		0,22
13–16		0,34
17–20		0,50
21–24		0,75
25–28		1,12

Суммарная доза за 24 дня = 12,8 $ЛД_{50}$, максимальная продолжительность эксперимента 24±4 дня.

$$K_к = \frac{ЛД_{50}n}{ЛД_{50}1},$$

где $К_К$ — коэффициент кумуляции, $ЛД_{50}$ n — средняя смертельная доза при n-кратном введении, $ЛД_{50}1$ — средняя смертельная доза при однократном введении.

При этом $К_К < 1$ говорит о кумуляции, $К_К > 1$ — характеризует привыкание.

Изучение хронической токсичности

Целью хронических фармакотоксикологических экспериментов является характеристика степени повреждающего действия фармакологического вещества при его длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование степени обратимости вызываемых им повреждений.

Продолжительность введения фармакологического вещества при изучении хронической токсичности зависит от предполагаемой длительности при применении в клинике (Таблица 51).

Таблица 51

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ВЕЩЕСТВА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ У ЧЕЛОВЕКА

Длительность применения препарата у человека	Длительность введения фармакологического вещества животным
Однократное введение	5–7 дней
2–6 дней	14 дней
7–14 дней	1 месяц
15–30 дней	2–4 месяца
1-6 месяцев	6-12 месяцев

Пути введения фармвещества. Основным способом введения фармакологического вещества является способ, рекомендованный для клинического изучения. Фармакологическое вещество, предназначенное для применения внутрь, вводят лабораторным животным через зонд в желудок или закладывают на корень языка, так как это обеспечивает более точное дозирование, чем добавление фармакологического вещества в корм. Количество фармакологического вещества, получаемого животным за один прием, рассчитывают на единицу массы тела животного в пересчете на действующее вещество, (можно вести расчет на единицу поверхности тела). Фармакологическое вещество вводят в виде субстанции и той лекарственной формы, которая будет передана в клинику.

Исследуемые дозы. Хроническую токсичность фармакологического вещества при его системном применении исследуют в двух-трех (как правило, в трех) дозах. При выборе доз руководствуются результатами, полученными при исследовании острой токсичности фармакологического вещества, его способностью вызывать кумулятивный эффект, а также максимальными суточными дозами, в которых фармакологическое вещество рекомендовано для клинического изучения.

Введение высшей дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов и гибель части животных. Эта доза может быть рассчитана с учетом $ЛД_{50}$, полученной при изучении острой токсичности исследуемого вещества для данного вида лабораторных животных. Минимальная доза должна быть близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения. Третья доза является промежуточной. При постановке экспериментов обязательно наличие контрольной группы животных, содержащихся в таких же условиях, как и подопытные, и получающих вспомогательные ингредиенты, входящие в состав исследуемой лекарственной формы фармакологического средства, тем же способом, при котором изучают токсичность самого вещества.

Фармакологические вещества, предназначенные для ежедневного применения у человека, вводят экспериментальным животным 7 дней в неделю.

От оценки пользы и риска фармвеществ – к клиническим испытаниям

На протяжении всего опыта животные должны находиться под ежедневным наблюдением; отмечают потребление корма и воды, состояние волосяного покрова и слизистых оболочек, поведение. 1 раз в неделю животных взвешивают, регулярно (в опыте продолжительностью до 1 мес. — не менее 2 раз, при более длительном исследовании — не менее 3 раз) исследуют функциональное состояние сердечно-сосудистой, нервной, эндокринной, выделительной и пищеварительной систем, изучают морфологические и биохимические показатели крови. Методы исследования для оценки функционального состояния органов и систем организма выбирает исследователь: они должны быть современными и достаточно чувствительными, чтобы обеспечить регистрацию признаков возможного повреждающего действия изучаемого фармакологического вещества.

Все животные, погибшие в течение опыта, подвергаются вскрытию для установления характера повреждающего действия фармакологического вещества. После окончания введения фармакологического вещества

проводят максимально полное обследование экспериментальных животных с помощью гематологических, биохимических и физиологических тестов. Часть животных из каждой группы забивают для патоморфологических исследований. Определяют массу органов и проводят их гистологическое исследование. За животными, оставленными в живых, проводят наблюдение в течение 1 месяца, после чего их обследуют в том же объеме, что и животных, забитых сразу после окончания введения фармакологического вещества. Для исследования динамики развития возможной интоксикации периодически определяют изучаемые параметры. Опыты на мелких лабораторных животных проводят с таким расчетом, чтобы полученные результаты можно было подвергнуть статистической обработке.

При оценке изменений, наблюдаемых у животных в хроническом токсикологическом эксперименте, необходимо исключить возможность влияния всех побочных факторов, не связанных с приемом препарата (заболевание животных, их питание, содержание и т. п.).

Могут возникнуть спонтанные изменения гемограмм, биохимических показателей и анатомических характеристик, которые следует учитывать при объяснении результатов. Не следует пренебрегать необъясненными данными, их надлежит подвергнуть дальнейшему изучению.

В ряде случаев в дополнение к указанным выше методам может потребоваться применение электронной микроскопии, гистохимических, авторадиографических и других методов исследования.

Патологические изменения, возникающие у животных после введения высоких доз фармакологического вещества, дают ценную информацию для характеристики его токсических свойств, однако эта информация должна быть подвергнута тщательному анализу и полученные результаты следует рассматривать в качестве предупреждения, а не противопоказания для клинических испытаний.

При решении вопроса о возможности передачи препарата на клиническое изучение исследователь должен учесть следующие факторы:

- ✓ терапевтическую широту фармакологического вещества, т. е. соотношение минимальной токсической и терапевтической доз.
- ✓ характер и обратимость выявленной патологии.

Заключение должно содержать суждения исследователей о степени опасного острого и хронического отравления на основании проведенных исследований, прогноз возможных побочных реакций и необходимых ограничений при клинических испытаниях.

Результаты доклинических токсикологических исследований фармакологического вещества являются частью материалов, оцениваемых в аспекте пользы и риска при разрешении клинических испытаний.

При изучении **аллергизирующих свойств** оценивают способность лекарственного средства вызывать при введении в организм состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсибилизация), в основе которой лежат различные иммунопатологические механизмы.

Основная задача доклинического изучения влияния потенциальных лекарственных средств на иммунную систему состоит в том, чтобы в эксперименте на животных доказать или исключить возможность развития **иммунотоксического действия**, вызванного фармакологическим средством или его метаболитами.

Изучение **репродуктивной токсичности** – влияния лекарственных средств на генеративную функцию, развитие плода и потомства – является обязательной частью доклинического изучения их безопасности, поскольку по статистике до 80% женщин применяют какие-либо медикаменты во время беременности, и около 3% новорожденных имеют родовые дефекты или аномалии развития. Этиология более чем половины врожденных дефектов у человека неизвестна. Определенную долю в этой части составляют лекарственные препараты. Лекарственное вещество может обладать эмбриотоксическим действием, оказывая прямое токсическое действие на плод после проникновения через плацентарный барьер либо воздействуя на плаценту или материнский организм. Эмбриотоксичность может проявляться как в повышении уровня эмбриональной гибели (эмбриолетальное действие), так и в виде анатомических, гистологических, цитологических, биохимических, нейрофизиологических отклонений от нормы (тератогенное действие), проявляющихся до или после рождения. Эмбрио- и фетотоксичность могут проявляться в изменении массы тела, краниокаудального размера плода, задержке оссификации скелета (общая задержка развития), увеличении смертности. Могут наблюдаться различные отклонения в развитии потомства. Выявление в эксперименте такого рода отдаленных эффектов лекарств имеет большое практическое значение в антенатальной охране здоровья детей. Изучение воздействия фармакологических веществ на отдельных стадиях репродукции позволяет не только избежать отрицательных моментов, связанных с длительным введением препаратов, но и приблизить экспериментальные условия к клиническим (Смольникова Н.М., 2003).

Исследование **мутагенности** (действие вещества, способное вызвать изменения генетического аппарата клетки и приводящее к изменению наследственных свойств) предусматривает оценку способности лекарственных средств к индукции различных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках и делает необходимым использование для оценки мутагенных свойств лекарств комплекса методов, выполняемых на разных тест-объектах. Это учет хромосомных аберраций или микроядер в

клетках костного мозга млекопитающих и учет генных мутаций с использование в качестве тест-объекта микроорганизмов или дрозофилы.

При изучении **канцерогенности** (действие вещества, способное вызывать развитие опухолей) лекарственные средства подразделяют на принципиально новые, не имеющие химических аналогов, вновь синтезируемые в известном химическом ряду, и воспроизводимые. Подходы к решению вопроса о тестировании на канцерогенность указанных групп различаются. Обязательному тестированию на канцерогенность в хроническом эксперименте должны подвергаться вновь синтезируемые лекарственные средства, рекомендуемые: в качестве профилактических, лечебно-косметических, репеллентных средств и контрацептивов; для применения в течение всей жизни длительными (более 15 дней) курсами; для использования без назначения врача среди широких слоев населения; для применения в детской практике, а также для лечения беременных женщин и кормящих матерей.

Основные задачи токсикологического исследования лекарственных средств:

- ✓ описать токсическое действие лекарственного средства;
- ✓ определить его зависимость от дозы, длительности и пути введения;
- ✓ определить роль метаболитов;
- ✓ выявить наиболее чувствительные органы-мишени и/или системы органов-мишеней;
- ✓ выявить клинические признаки токсического действия;
- ✓ определить параметры специфической токсичности лекарственного средства – его возможное аллергизирующее, иммунотоксическое, мутагенное, канцерогенное действие и репродуктивную токсичность;
- ✓ определить опасность вещества для окружающей среды;
- ✓ дать рекомендации по клиническому применению препарата.

При комплектовании групп экспериментальных животных для хронического токсикологического эксперимента надо иметь в виду необходимость исследования динамики возможного токсического эффекта исследуемого фармакологического вещества, для чего следует производить поэтапный забой животных в процессе введения препарата и в различные сроки после окончания его введения с целью выявления обратимости наблюдаемой патологии.

В Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2005 г.) представлены материалы, охватывающие практически весь спектр экспериментальных методов, необходимые для качественного проведения доклинических исследований эффективности и безопасности новых перспективных лекарственных средств, но недостаточно полно даны характеристики видов и линий животных, а также технологий их использования.

Глава 15

Животные и альтернативные модели для оценки противовирусных средств

Проблема поиска эффективных противовирусных препаратов обусловлена высокой заболеваемостью и широкой распространенностью вирусных инфекций, сопровождающихся частым развитием затяжных и хронических форм, тяжелыми последствиями для детей раннего и лиц преклонного возраста. Несмотря на интенсивный скрининг, проводимый во всем мире, количество противовирусных препаратов при ряде инфекций ограниченно, а при некоторых инфекционных заболеваниях их нет совсем. В значительной степени это объясняется особенностями паразитизма вирусов, поражающих геном клетки. С этим связано важное требование к поиску противовирусных препаратов, которые должны либо непосредственно воздействовать на сам вирус, не повреждая клетки, в которой он паразитирует, либо обладать способностью активации выработки эндогенного интерферона. Все это определяет трудности поиска эффективных в условиях организма препаратов, хотя в экспериментальных условиях *in vitro* нередко многие вещества могут вызвать прямое ингибирующее действие на внеклеточный вирус.

Скрининг противовирусных препаратов

Начальным этапом изучения противовирусных препаратов является первичный отбор (скрининг), который должен быть высоко производительным, простым и доступным для каждой вирусологической лаборатории. Он состоит из двух этапов: испытания *in vitro* – в культуре клеток и *in vivo* – в опытах на животных.

Методы испытаний

Химиотерапия вирусных инфекций начинается с испытаний веществ синтетического или природного происхождения в культуре клеток. Оценка антивирусной активности препаратов в культуре клеток предполагает контроль репродукции вируса. Для этого используют методы, применяемые для определения инфекционной активности вируса:
1) цитопатогенное действие (ЦПД),
2) метод флуоресцирующих антител (МФА),
3) метод ингибиции бляшкообразования,
4) реакция гемагглютинации,
5) реакция гемадсорбции,
6) методы электронной микроскопии,
7) микрометод,
8) радиоизотопный метод,
9) метод иммуноферментного анализа,
10) информационные ресурсы (компъютерная модель живой клетки).

Критерии оценки

При проведении исследований по отбору противовирусных препаратов важна адекватность критериев оценки. Такие критерии применимы к исследованиям на культуре клеток: 1) при проведении первичного отбора и 2) при оценке избирательности противовирусного действия. Применение культур клеток является наиболее дешевым и быстрым методом оценки противовирусной активности соединений. На 1-м этапе первичного отбора соединения подразделяют на активные и неактивные. Вещества, проявившие активность на 1-м этапе, дополнительно изучают по следующим показателям: снижение инфекционного титра, подавление репродукции вируса в условиях одноциклового опыта, величина химиотерапевтического индекса (ХТИ). Основным критерием при изучении специфического противовирусного действия соединений является показатель ХТИ, определяемый отношением среднетоксичной концентрации вещества ($СТ_{50}$) к среднеэффективной вирусингибирующей концентрации ($ЕД_{50}$). Величина ХТИ наиболее достоверно характеризует специфическую противовирусную активность исследуемого вещества. Исследование вирусингибирующей активности соединений показало, что наиболее однородной является группа веществ, ХТИ которых равен 8 и более. Оптимальный срок контакта изучаемого соединения с культурой клеток при определении максимально переносимой концентрации (МПК) соответствует периоду максимального функционирования клеточных культур (в среднем 4 суток). Выраженную активность проявляют соединения, у которых снижение титра вируса при действии МПК вещества составляет не менее 2,0 lg, подавление репродукции вируса в условиях одноциклового опыта — на 1,25–2,0 lg и ХТИ 8 и больше. Эти соединения можно считать перспективными для дальнейших исследований в опытах на животных.

Система оценки

Основной задачей данного начального этапа исследований является выявление первичной специфической противовирусной активности тестируемых веществ с помощью объективных методов испытания. Основы схемы испытаний являются общими независимо от используемого типа вируса, а специфические особенности репликации вируса того или иного семейства могут иметь свои методические приемы. Оценка противовирусного действия соединений включает 3 последовательных этапа, когда вещества, проявившие активность на 1-м этапе, изучают на 2-м и т.д. Для 1-го этапа рекомендуются скрининг-тест и МФА-1, которые позволяют одновременно оценить пороговую токсическую дозу вещества и первичный ингибирующий эффект. Избирательность противовирусного действия устанавливают на 2-м этапе. Метод торможения (редукции бляшек) позволяет дать количественную оценку с расчетом титра вируса. Снижение титра вируса можно определить также по ЦПД и МФА-2. 2-й этап предполагает изучение вирусингибирующего действия соединений одним из указанных методов в условиях многоциклового опыта. При одном цикле репродукции вируса исследуется действие препарата на разные стадии репродукции вируса (3-й этап). Следовательно, использование культур клеток позволяет достаточно быстро и с большой достоверностью оценить противовирусную активность веществ. Результаты этого этапа исследований позволяют говорить о перспективной значимости исследуемого вещества и необходимости его испытания в опытах на животных.

Клеточные или животные модели?

Традиционные методы первичного исследования противомикробной и противовирусной активности веществ были разработаны к началу 60-х годов, затем они были усовершенствованы, но и к настоящему времени они не могут считаться окончательно сложившимися и обоснованными. Так, анализ современной литературы свидетельствует о том, что методы и схемы оценки противовирусных препаратов, используемых исследователями, различны, что приводит к несопоставимым, а порой и противоречивым результатам. Это обстоятельство определяет необходи-

мость разработки системы стандартных методов и схем оценки для отбора потенциальных противовирусных препаратов как средств профилактики и лечения вирусных инфекций.

Следующим этапом изучения противовирусного действия соединения, оказавшегося эффективным в культуре клеток, является экспериментальная его оценка при инфекциях у животных. Корреляция между вирусингибирующей активностью веществ в культуре клеток и в опытах на животных существует не всегда. Отсутствие корреляции обусловлено патогенетическими особенностями конкретной моделируемой вирусной инфекции и химической структурой вещества.

Основным требованием к экспериментальной модели вирусной инфекции является адекватность ее соответствующему заболеванию человека. Большинство вирусных инфекций моделируются на мышах, чувствительность которых к различным вирусам далеко не одинакова. Путь инфицирования зачастую отличается от естественного пути заражения человека, что накладывает свои особенности на патогенез заболевания. Тем не менее использование конкретной экспериментальной модели на мышах дает ценную первичную информацию об эффективности изучаемого препарата.

Выбор доз заражения

При моделировании смертельных вирусных инфекций для данного вида животного обычно используют несколько доз заражения в диапазоне 1—10—30 $ЛД_{50}$. При получении положительного результата (выживаемость) инфицирующую дозу можно повысить до 100 $ЛД_{50}$ и более. Эффективность веществ может быть выявлена и при использовании минимальных инфицирующих доз (порядка 1—10 $ЛД_{50}$).

При моделировании не смертельных вирусных инфекций, когда показателем оценки эффективности препарата не является выживаемость, величина дозы заражения должна быть максимальной (с учетом титра вируса).

Нелетальные модели и дизайн исследования

Для создания модели инфекционного заболевания у животного необходимо использовать тот путь инфицирования, который соответствует естественному пути заражения человека данной инфекцией. При отсутствии чувствительности животного используют другие пути заражения с учетом тяжести течения инфекции, при этом очень важен выбор сроков наблюдения за инфицированными животными. Длительность максимального наблюдения за животными при острых вирусных инфекциях определяет показатели сроков максимальной и остаточной смертности. Так, например, при периферическом заражении белых мышей патогенным штаммом тоговируса восточного энцефаломиелита лошадей (ЕЕЕ) в дозах 5—10 $ЛД_{50}$ и выше сроки максимальной гибели животных соответствуют 7-му дню после заражения, а остаточная гибель – 10-му. Исходя из этих показателей сроки максимального наблюдения за инфицированными животными составляют 14—21 день.

Рассматривая нелетальные модели вирусных инфекций с использованием неадаптированного вируса, сроки наблюдения за животными определяются динамикой накопления вируса в чувствительных органах. Так, например, при интраназальном заражении белых мышей тоговирусом Пиксун максимальное накопление возбудителя в чувствительных органах (головной мозг и селезенка) соответствует 120 ч после заражения, а спустя 168 ч вирус не репродуцируется. На этом основании сроки максимального наблюдения за инфицированными животными соответствуют 7 дням (168 ч).

Немаловажное значение в моделировании вирусных инфекций имеют штаммовые особенности вируса. В данном случае речь идет о том, что при использовании в исследованиях различных штаммов вируса одного семейства можно получить неадекватные результаты. Так, например, вирус гриппа A WSN оказался резистентным к ремантадину, который, в свою очередь, обладает селективным ингибирующим действием в отношении почти всех эпидемических штаммов вируса гриппа А последних лет. Выявлены штаммовые различия в чувствительности белых мышей как у одного вируса (штаммы Софьин и Пан), так и у различных вирусов комплекса клещевого энцефалита.

Валидность экспериментальных вирусных инфекций

При моделировании экспериментальной вирусной инфекции (ЭВИ) необходимо использовать эталонные штаммы вируса (по таксономической квалификации – типичный представитель). При получении положительных результатов в дальнейшем можно использовать штаммы тестируемого вируса, имеющие наиболее важное значение в эпидемиологической и клинической практике.

И наконец, следует при моделировании ЭВИ отметить большое значение для оценки достоверности результатов испытаний однородности возраста, массы и генотипа подопытных животных. Так, например, показана зависимость генотипа животного и штаммовых особенностей вируса на течение экспериментального клещевого энцефалита у белых мышей. При подкожном заражении мышей линии CBA и C57Bl/6 массой

18–20 г выявлены межлинейные различия в чувствительности животных. Для моделирования ЭВИ важно использовать животных наиболее чувствительных линий, одинаковой массы и одного возраста.

После выбора соответствующей экспериментальной модели определяют эффективность действия препарата при различных способах введения по профилактической и лечебной схемам, а также влияние препарата на репродукцию вируса в органах и тканях и др.

Для выбора разовой и суточной доз препарата и схем его введения необходимо провести опыты по определению его острой токсичности хотя бы при трех путях введения, одним из которых является способ, рекомендуемый для применения в клинике.

Результаты дальнейших исследований должны определить целесообразность того или иного пути введения препарата для обеспечения химиотерапевтического эффекта.

Доза препарата для различных видов животных должна быть эквивалентна дозам, предлагаемым для клинического испытания при перерасчете на единицу поверхности тела. Каждая экспериментальная группа должна состоять не менее чем из 10 животных (для крупных – обезьян, собак –до 5).

Схемы и критерии оценки препаратов

Схемы оценки эффективности препаратов подразделяются на профилактическую и лечебную. Профилактическая схема предусматривает введение препарата до или в момент заражения и в течение инкубационного периода. При изучении лечебной схемы препарат назначают с момента появления первых симптомов заболевания до полного купирования инфекции.

При изучении профилактической эффективности препарата вначале используют концентрации препарата, соответствующие $^1/_8$, $^1/_{16}$, $^1/_{32}$ $ЛД_{50}$, в условиях однократного введения. При разработке схем многократного назначения препарата используют данные, полученные при его однократном назначении.

Критериями оценки эффективности действия препарата являются степень защиты (%), средняя эффективная доза ($ЕД_{50}$) по показателю выживаемости, средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных и величина ХТИ.

Клиническое выздоровление животных должно быть подтверждено вирусологическими исследованиями.

Данные критерии позволяют определить степень активности препаратов на основе количественных показателей. Препараты, при введении которых степень защиты животных составляла до 30%, следует считать неактивными, а 70% и выше – активными. Показатель эффективности препарата (степени защиты животных) определяется при использовании для заражения животных трех инфицирующих доз (5–10–30 $ЛД_{50}$).

Обязательными показателями, характеризующими защитные свойства исследуемых препаратов, являются $ЕД_{50}$ и степень защиты при испытании средства по профилактической и лечебной схемам. $ЕД_{50}$ – это показатель (величина) суточной дозы препарата (мг/ЕД), которая обеспечивает защиту 50% животных. $ЕД_{50}$ вычисляют графически или по методу Кербера при использовании одной (постоянной) инфицирующей дозы.

СПЖ животных отражает динамику выживаемости до момента гибели и выражается в днях. Этот показатель также объективно отражает противовирусное действие препарата. Показатели $ЕД_{50}$ и СПЖ в экспериментальной группе (для оцениваемого препарата) должны существенно отличаться от таковых контрольной группы. Величина ХТИ должна строго обосновывать рекомендуемый диапазон лечебных доз препарата при конкретном пути его введения в организм.

Глава 16

Современные тенденции оценки биомедицинской безопасности

Международное научное сообщество находится в активном поиске новых путей оценки биомедицинской безопасности с использованием как новых перспективных моделей животных-млекопитающих, так и альтернативных моделей. Практически ежегодно осуществляется пересмотр и ревизия новых методов исследования и оценки безопасности веществ и материалов. Это тем более важно, что последние достижения в области нанотехнологий выявили неготовность биомедицинских технологий в этом направлении. Требуется создание единого информационного ресурса по вопросам безопасности наносубстанций, наномедпрепаратов и нановакцин, а также накопление и учет физико-химической, токсиколого-гигиенической, эколого-токсикологической информации об исследованных наносубстанциях, нанопрепаратах и нанолекарствах.

В настоящее время в России пока отсутствуют учреждения, проводящие доклинические исследования, полностью соответствующие и аккредитованные по международной системе GLP. Несмотря на введение с марта 2010 года в действие Национального стандарта Российской Федерации «Принципы надлежащей лабораторной практики – GLP» (ГОСТ Р 53434-2009), в стране отсутствуют единые принципы и требования проведения доклинических исследований, гармонизированных с международными стандартами. Поэтому мы сочли необходимым отразить в нашем Руководстве некоторые важнейшие принципы и подходы, соответствующие мировым тенденциям.

Определяющим принципом при оценке биомедицинской безопасности лекарств, вакцин и других веществ и материалов является минимизация количества животных при исследовании химических, биологических или минеральных соединений. *Общепринятый прием* оценки LD_{50} в соответ-

ствии с Системой глобальной гармонизации (Globally Harmonised System – GHS) предусматривает интервалы достоверности, ранжирования и классификации субстанции. *Базовым методом* является *процедура фиксированной дозы* с общепринятым обозначением TG 420 (Test Guideline, Руководств по тестам) для условий перорального введения веществ.

Острая токсичность – это когда введенное в однократной или многократных дозах в течение 24 ч вещество нарушает функции, морфологическую картину органов, вызывает гибель животных.

В соответствии с тестом TG 420 в исследование включают группы животных, предпочтительно одного пола, обычно самок, получающих дозы препарата в ступенчатой процедуре. Предпочтительный вид грызунов – крыса, которой проверяемая субстанция вводится в одинарной дозе через желудочный зонд. Допускается дробное введение субстанции небольшими частями, в течение периода, не превышающего 24 часа. Используются фиксированные дозы по 5, 50, 300 и 2000 мг/кг, а в отдельных случаях может быть исследована доза в 5000 мг/кг.

Первоначальный уровень дозы выбирают исходя из ожидаемого уровня, при котором наблюдаются сразу несколько симптомов токсичности без причинения явных эффектов отравления или летального исхода и основанного на данных *in vivo* или *in vitro*. Если такой информации нет, то стартовая доза принимается равной 300 мг/кг. Следующие группы животных могут получать более высокие или низкие дозы, в зависимости от наличия или отсутствия симптомов отравления. Эта процедура продолжается до тех пор, пока не будет определена доза, вызывающая отравление.

Животные наблюдаются ежедневно 14 дней, в течение которых фиксируются изменения кожи и меха, глазных и слизистых мембран, дыхательной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной систем, соматомоторной активности и поведения особей. Отмечается явление тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сонливости и комы. В эксперименте должны быть учтены принципы и критерии, включенные в документ «Human Endpoints Guidance Document». Вес каждого конкретного животного, включенного в эксперимент, должен быть определен до и после введения субстанции. Обязательным условием должно быть проведение патоморфологических исследований.

Использование мини-свиней в оценке биомедицинской безопасности

Биоэтическая парадигма ориентирует на ограничение использования в биомедицинских технологиях целого ряда животных (обезьяны, собаки и т.д.) и поиску других животных-моделей.

В начале 1990-х гг. мини-свиньи были введены в эксперименты по токсикологии как альтернатива негрызунам. Основной причиной для введения была реализация многих биохимических, анатомических и физиологических черт, схожих с человеком, относительно других видов негрызунов. Мы считаем необходимым дать более подробную характеристику использования мини-свиней как принятых в международной биомедицинской практике животных-моделей.

Фармакокинетические исследования легко проводятся на мини-свиньях с повторяющимся забором образцов крови или образцов других видов жидкостей из тела или тканей.

Администрирование доз и техника взятия проб – это оральные процедуры с использованием желудочного зонда или дозировки диеты с добавлением медикаментов в корм. Дозирование с помощью желудочного зонда у конвенциональных животных может вызвать стресс у животных. Анатомическое и физиологическое сходство кожи у человека и мини-свиньи весьма полезно для исследований. Эта процедура используется в токсикологических исследованиях кожи для острой токсичности и в процедуре повторяющихся доз, исследованиях дермальной абсорбции, исследованиях фототоксичности и исследованиях фоточувствительности. Парентеральные дозы могут быть применены в виде инъекций внутримышечно, подкожно, внутрикожно и внутривенно. Последнее может быть выполнено или с помощью введения большого количества жидкости (болюсов), или как продолжающиеся внутривенные инфузии. Детально продолжающиеся внутривенные инфузии были описаны, так же как и хирургическая подготовка для применения продолжающихся внутривенных инфузий. Другие процедуры, такие как носовые дозировки или дозировки ингаляций, также были успешно применены на мини-свиньях.

Наблюдения, требуемые в тестах на токсичность, такие как клинические симптомы, вес тела, офтальмоскопия и электрокардиография являются рутинными процедурами в тестах на токсичность, проводимых на мини-свиньях.

Репродуктивная токсикология. Как известно, в тестах на репродуктивную токсичность обычно используются два вида животных: грызуны и негрызуны. Обычно используют крыс и кроликов. Мини-свиньи могут быть альтернативным видом в тератогенетических и репродуктивных исследованиях, когда традиционные виды, такие как мыши, крысы, кролики, являются неподходящими. Нечеловекообразные обезьяны имеют ограничения по количеству и сохранности и, главным образом, из-за того, что они приносят только одного детеныша. Мини-свиньи соответствуют SPF-стандартам, относительно недороги и имеют сходные с человеком анатомические и физиологические особенности. Репродуктивные характеристики светлогорских мини-свиней были описаны совместно с протоколом тератогенетических тестов и записями контрольных данных. Протокол тестирования может быть кратко описан следующим образом. Половой зрелости светлогорские мини-свиньи достигают в 8-месячном возрасте. Обычно самый хороший возраст для включения в эксперимент 8–12 месяцев. Тератогенетические исследования длятся от начала имплантации (день 11) до закрытия жесткого неба (день 35), включая беременность.

Могут быть использованы различные процедуры наблюдения. Наиболее широко применяют оральные процедуры, но может быть также применена процедура продолжающихся внутривенных вливаний. Беременность может контролироваться ультрасонографией на 4-5 неделе беременности. Свиней забивают на 110–112 день беременности. Так как вес плода составляет 300–450 г, возможно, провести полную аутопсию эмбрионов. Обычно протокол включает эмбриональные исследования после изъятия из матки и окраску скелета. Для изучения скелета можно добавить рентген, так как кости скелета и плотность костей лучше визуализируются, чем при окрашивании ализарином. Сетлогорские мини-свиньи весьма подвержены тератогенетическим эффектам третиноина с пороками развития, похожими на тератогенетический эффект ретиноловой кислоты у людей.

Светлогорские мини-свиньи полезны как модель изучения эффектов мужского оплодотворения. Показано, что самцы мини-свиней более подвержены химическим воздействиям с побочными (вредными) эффектами на способность оплодотворения, чем самцы крыс. Мини-свиньи имеют большее сходство с человеком в норме оплодотворения, проценте морфологически ненормальной спермы, проценте спермы со способностью к движению и вероятностью крипторхизма.

Ювенильные исследования были введены в доклинические программы, так как некоторые лекарства являются проблемными для детей без проверки безопасности их использования в аналогичной возрастной группе. Стандарт доклинических исследований должен включать профиль безопасности для всех педиатрических групп, особенно в реакциях развивающегося мозга, дыхательной системы, почек, репродуктивной и иммунной систем. Это послужило мотивировкой в США и Евросоюзе по разработке руководства для доклинических исследований на ювениль-

ных животных для фармацевтики педиатрических показателей. Традиционно крысы и собаки, но не свиньи являлись видами, выбираемыми для исследований.

Оценка годности мини-свиней для такого рода исследований была проведена учеными разных стран. Протоколы для проведения ювенильных исследований включают подсадку всех животных к одной матери для того, чтобы избежать эффекта случайности. Подсадка молодняка мини-свиней для подготовки ювенильных токсикологических исследований является важной практикой подготовки для последующего содержания в лаборатории тестирования. На ювенильных мини-свиньях проводят такие исследования, как оральное или парентеральное дозирование, офтальмоскопия, ЭКГ и повторяющийся забор проб крови для клинической патологии и токсикокинетики. Имплантация венозных портов для ежедневной внутривенной дозировки была удачной начиная с 7 дня и далее. Клинико-патологические данные очень важны, так как многие стандартные параметры изменяются с возрастом.

Правовые вопросы. Свиньи и мини-свиньи как модель в тестах на токсичность фармацевтических и других химических веществ в настоящее время принята в Японии, ЕС и США. Свиньи и мини-свиньи особенно упоминаются как потенциальный вид не грызунов в руководствах Японии и Канады. Свиньи и мини-свиньи внесены в руководство OECD 409.

Таким образом, мини-свиньи являются полезным видом негрызунов в исследовании безопасности лекарств. Однако отбор наиболее подходящих видов является комплексным. Многие фармацевтические предприятия содержат собак как первый выбор и исходят от собак при своих оценках. Мини-свиньи могут быть коммерчески неподходящими животными в основном из-за живого веса, так как они требуют большего количества тестов. Светлогорские мини-свиньи выращиваются в соответствующих условиях, которые обеспечивают в результате должный иммунологический статус. Реальной отдачей для фармакологии и токсикологии является то, что выбор мини-свиней для оценки лекарств имеет биоэтические, аллометрические, таксономические и экстраполяционные преимущества.

Использование рыб в экспериментальной работе

В настоящее время EPA продолжает использовать тесты *in vitro* для оценки острой токсичности у рыб. Одна из альтернатив была описана в TETRATOX, в которой используется *Tetrahymena* как биологический маркер в оценке экологического риска загрязнения воды. Биохимия и

физиология *Tetrahymena* была изучена еще в 1950-х гг., и *Tetrahymena*, и особенно *T.pyriformis*, широко используются с 1970-х гг. для определения токсичности в тестах воды. Более того, геномы организмов хорошо изучены. Популяция *T.pyriformis* растет в тесте быстро, инэкстенсивно и широко. Данные, полученные в TETRATOX, демонстрируют высокую степень соответствия данным, полученным в исследованиях рыб.

Последние годы интенсивно развиваются исследования на рыбах *Danio rerio* и теляпиях, в том числе для оценки токсичности лекарств и ксенобиотиков. В мире существуют примерно 20 тыс. видов рыб, это примерно половина от всех живущих на Земле позвоночных. Рыбы сильно варьируют по своим размерам, таксономии, морфологии, генетике, поведению, физиологии и экологии. Поэтому невозможно дать одно руководство по их содержанию и разведению. Однако можно выделить отдельные общие принципы.

Отбор видов рыб, независимо от того, морские, пресноводные или рыбы солоноватой воды, сопровождается необходимостью организации системы поддержки жизнедеятельности.

Приобретение рыб возможно только в легальных источниках. Если в работе используют рыб, выловленных в открытых водоемах, то требуется заключение ветеринарной службы. Отлов рыб для клинических испытаний проводят в соответствии с существующими стандартами и законодательством.

Транспортировка рыб должна проводиться только с соблюдением требований по снижению стресса. В США и Канаде перед транспортировкой рыб не кормят за 2-4 дня до перевозки, чтобы снизить вероятность загрязнения воды, и столько же дней дают ограниченное количество корма, чтобы затем перейти на обычный рацион.

Научно-исследовательский и обслуживающий персонал должен обладать соответствующей квалификацией по содержанию рыб, чтобы предотвратить стресс и возможные ранения рыб при их вынимании. В руках рыб надо держать как можно более короткое время. Сети и другое оборудование, которое применяют для отлова рыб, должно быть мягким, неповреждающим кожу рыбы. При необходимости можно использовать химические средства для обездвиживания.

Акклиматизация рыб должна проводиться с минимальным стрессом. Температура воды в танках для содержания рыб должна быть такой же, как и в транспортных контейнерах и в природных водоемах. Рыбы лучше переносят понижение температуры, чем ее повышение. В первые дни рыб лучше не тревожить.

Карантин необходим для новых партий рыб кроме случаев, когда рыб получают из тех же источников. Практикуется полное отделение

рыб. Для минимизации вероятности получения патогенов может быть проведена стерилизация: химическим способом, озонацией или ультрафиолетом.

Танки и другое оборудование для перевозки должны иметь такую конструкцию и быть изготовлены из таких материалов (пластик или фибра), чтобы минимально травмировать рыб. Размеры и конкретная конструкция подбираются в соответствии с видом рыб. Конструкции не должны содержать медь, никель, кадмий или латунь. При использовании поливинила надо следить за тем, чтобы он не выделял ацетона, метилэтиленкетонов и тетрагидрофуранов.

Качество воды должно определяться в процессе биологической, механической и химической фильтрации и дезинфекции. В течение дня необходимо контролировать pH, содержание кислорода, азота, аммония, окиси углерода, солей и твердых примесей.

Температура воды влияет на репродуктивные способности, здоровье, поведение, особенности кормления рыб. Температура зависит от вида рыб и подбирается в процессе акклиматизации.

Освещение как естественное, так и искусственное зависит от вида рыб. Хотя большинство рыб нормально себя чувствуют при 12-часовом дне и 12-часовой ночи, для большинства рыб достаточно 8–10-часового дня, 12-14-часовой день необходим для тропических рыб. Дня установления циклов освещенности используют таймер. В аквариумах обычно ставят флуоресцентные лампы для искусственного освещения.

Плотность поголовья рыб и движение воды зависят от их вида. Слишком большие пространства могут быть нежелательны для самочувствия рыб. Оптимальное количество рыб в аквариуме зависит от многих факторов, включая качество, движение и температуру воды. При более высокой температуре снижается содержание кислорода, что может потребовать снижения количества рыб. Воды должно быть достаточно, чтобы рыбы могли плавать свободно.

Кормление рыб. Некоторые виды рыб являются травоядными, некоторые – плотоядными, некоторые – всеядными. В соответствии с этим подбирается тип кормления. Можно использовать приготовленные промышленным способом корма. Кормление осуществляют 1 или 2 раза в день в течение 5 рабочих дней, хотя может потребоваться и более частое кормление, а также кормление в выходные дни. Кормление с рук при соблюдении всех гигиенических требований приветствуется, так как позволяет выявить возможные проблемы.

Программа контроля здоровья осуществляется ветеринаром или квалифицированными работниками, знакомыми с особенностями лечения

рыб. Персонал необходимо обучить и снабдить необходимым оборудованием для мониторирования здоровья рыб.

Анальгезия, анестезия и инвазивные процедуры проводятся квалифицированным персоналом в случаях, когда необходимо успокоить, обездвижить или обезболить рыбу, особенно при инвазивных процедурах. После применения анестезии рыбы должны быть помещены в аквариумы, обогащенные кислородом без анестезии.

Эвтаназия, если она необходима, должна быть гуманной. Методы эвтаназии включают гипотермию, электрошок, большие дозы Tricaine Methanesulfonate (Finquel, MS-222) или диоксид углерода, или отсечение головы острым ножом. MS-222, введенный в дозе 500 мг/л, может вызвать боль и стресс. При использовании химических средств в процессе эксперимента можно применять физические методы эвтаназии. Во всех случаях надо проконсультироваться с ветеринарной службой.

Опасные виды и зоонозы. В процессе работы надо избегать возможных травам персонала при работе с опасными видами, а также возможности заражения болезнями, переносимыми рыбами. Надо применять правила техники безопасности для снижения этих рисков.

Стандартизованные модели токсичности

Программа OECD обеспечивает механизм развития новых или обновления существующих *Руководств по использованию тестов* TG *(Test Guideline)*. OECD TG широко используется мировым научным сообществом и признана авторитетами в странах–членах OECD и нечленах OECD. Совместное совещание Химического Комитета с Работающей группой по химикатам, пестицидам и биотехнологии выработало политику по дальнейшему улучшению TG.

Разработанные новые методы проходят процедуру включения в *Руководство по использованию тестов*. Описание метода подается в Рабочую группу, которая рассматривает метод с точки зрения его целей, технического содержания, этических принципов при использовании животных, стоимости, соответствия национальным политическим требованиям. Затем Рабочая группа выносит метод на Общее обсуждение, которое проводится в среднем 1 раз в 8 месяцев. Вынесенное решение возвращается в Рабочую группу. При необходимости метод дорабатывается и вновь выносится на Общее обсуждение. Общее время, необходимое на внесение нового метода в Руководство, существенно варьирует, но в среднем оно занимает примерно 18 месяцев (Таблица 52).

Таблица 52

ПРОЦЕДУРЫ TG ДЛЯ КРАТКОСРОЧНЫХ И ДОЛГОСРОЧНЫХ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТОВ (ПО ДАННЫМ OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS)

TG	Наименование и комментарий
401	Острая пероральная токсичность (исключен). Принят 12.05.1981. Дата исключения: 20.12.2002 г.
402	Острая дермальная токсичность. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24 февраля 1987 г.: учтено требование уменьшения количества животных в эксперименте по сравнению с оригинальным методом снижения уровня используемых доз.
403 ТнЖ**	Острая ингаляционная токсичность. Принят 12.05.1981.
404 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия кожи. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия снижения количества животных и очистки от использования животных в соответствии с требованиями OECD* TG, включая тесты *in vitro*
405 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия глаз. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия снижения количества животных и очистки от использования животных в соответствии с требованиями OECD TG, включая тесты *in vitro*.
406 ТнЖ	Чувствительность кожи Принят 12.05.1981. Подтвержден 17.07.2002 как стратегия снижения количества животных до 50% по сравнению с оригинальным OECD TG.
407 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в повторяющихся дозах в течение 28 дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 27.07.2002 как стратегия очистки от использования животных по сравнению с оригинальным OECD TG, больше информации о практике дозировки, больше информации о таких же животных.
408 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в течение 90 дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
409 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у негрызунов в течение 90 дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
410 ТнЖ	Дермальная токсичность. Принят 12.05.1981.
411 ТнЖ	Субхроническая дермальная токсичность в течение 90 дней. Принят 12.05.1981.
412 ТнЖ	Ингаляционная токсичность тест повторяющихся доз в течение 14/28 дней. Принят 12.05.1981.
413 ТнЖ	Субхроническая ингаляционная токсичность в течение 90 дней. Принят 12.05.1981.
414 ТнЖ	Изучение развития пренатальной токсичности. Принят 12.05.1981. Подтвержден 22.01.2001, дает снижение количества животных по сравнению с оригинальным OECD TG до 20%, больше информации об аналогичных животных.
415 ТнЖ	Изучение первого поколения репродукционной токсичности. Принят 12.05.1983.
416 ТнЖ	Изучение второго поколения репродукционной токсичности. Принят 26.05.1983. Подтвержден 22.01.2001.
417 ТнЖ	Токсикокинетика. Принят 04.04.1984. Подтвержден 17.07.1995.
418 ТнЖ	Задержка нейротоксичности фосфорорганических субстанций, следующих за острыми проявлениями. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.
419 ТнЖ	Изучение задержки нейротоксичности фосфорорганических субстанций в повторяющихся дозах в течение 28 дней. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.
420 ТнЖ	Острая пероральная токсичность – процедура фиксированной дозы. Принят 17.07.1992. Подтвержден 17.12.2001, использован метод снижения и очищения от использования животных по сравнению с условиями метода TG 401, меньше страданий, меньшее количество животных в эксперименте.
421 ТнЖ	Тест скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 27.07.1995, метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, обеспечивая необходимую информацию с минимальным количеством животных.
422 ТнЖ	Комбинированное изучение токсичности в повторяющихся дозах с тестом скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 22.03.1996. Метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, комбинирует новые скрининговые тесты на репродукционную токсичность с TG 407 и еще больше снижает количество животных до абсолютного минимума при комбинации точек окончания эксперимента
423 ТнЖ	Острая пероральная токсичность – Класс методов острой токсичности (ATC). Принят 22.03.1996. Подтвержден 17.12.2001. Метод снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, используется значительно меньше животных (10% от требующихся в TG 401).
424 ТнЖ	Изучение нейротоксичности у грызунов. Принят 21.07.1997.
425 ТнЖ	Острая пероральная токсичность: процедура вверх-и-вниз. Принят 21.09.1998. Подтвержден 17.12.2001. Тест снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, требуется меньше животных, обеспечивающих точность оценки LD50 как в методах TG 420 и 423.
426 ТнЖ	Изучение развития нейротоксичности. Планируется в новом руководстве.
427 ТнЖ	Впитывание кожей: метод *in vivo*. Принят 13.04.2004.
428	Впитывание кожей: метод *in vitro*. Принят 13.04.2004. Хорошая альтернатива методу in vivo, для полной замены метода TG 427
429 ТнЖ	Чувствительность кожи: исследование местных лимфатических узлов. Принят 24.04.2002. Метод, снижающий и очищающий от использования животных по сравнению с TG 406, обеспечивает большим количеством информации и служит причиной меньших страданий
430	Коррозия кожи *in vitro*: Тест транскожной электрической устойчивости. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, использует метод замены животных в части коррозии теста TG 404.
431	Коррозия кожи *in vitro*: модель теста на коже человека. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, использует метод замены животных в части коррозии теста TG 404.
432	Тест фототоксичности *in vitro* 3Т3. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест. Полная замена, поскольку нет аналогичных тестов OECD TG на животных.

433 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций: процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 403, использует меньше животных и служит причиной меньших страданий.
434 ТнЖ	Острая дермальная токсичность: процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 404, использует меньше животных и служит причиной меньших страданий.
435 ТнЖ	Коррозия кожи *in vitro*. Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 404, для специфических целей, только для изучения кислот и оснований.
436 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций: Класс токсичности (ATC). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 403, использует меньше животных и служит причиной меньших страданий.
451 ТнЖ	Изучение канцерогенности. Принят 12.05.1981.
452 ТнЖ	Изучение хронической токсичности. Принят 12.05.1981.
453 ТнЖ	Комбинированное изучение хронической токсичности и канцерогенности. Принят 12.05.1981 как комбинирование исследований в тесте TG 453, может снижать количество животных по сравнению с использованием только TG 451 и TG 452.

**– OECD = Organization for Economic Cooperation and Development (Организация по экономической кооперации и развитию).*
*** – ТнЖ = тест на животных.*

Метод определения класса острой токсичности TG 423 аналогичен по выбору животных, целям и условиям выполнения методу TG 420 и состоит из последовательной процедуры с использованием трех животных одного пола (обычно самок) на каждом шаге. Отсутствие или наличие летальных исходов от определенной дозы вещества определяет следующий шаг, при котором дальнейшее тестирование больше не нужно, а необходимы три дополнительных особи для тестирования с той же самой дозой или по три дополнительных особи для тестирования с более высокой или более низкой дозами. Стартовая доза выбирается из четырех фиксированных уровней в 5; 50; 300 или 2000 мг/кг. Конечной дозой является та, которая с наибольшей вероятностью приведет к летальному исходу у некоторых из тестируемых животных. В случаях, когда такой информации нет, то стартовая доза принимается равной 300 мг/кг.

Процедура вверх-и-вниз TG 425 аналогична целям и условиям TG 420, но содержит прогрессию из одинарных доз, которые проверяются преимущественно на самках крыс в одно и то же время. Первое животное получает дозу на шаг ниже уровня LD_{50}, а если информация по предварительной оценке отсутствует, то стартовая доза берется равной 175 мг/кг. Если животное выживает, то доза следующего животного увеличивается в 3,2 раза от первоначальной дозы; если умирает, то доза следующего животного уменьшается в соответствующей прогрессии.

Оценка *острой токсичности ингаляций TG 403* дает информацию о возможности возрастания токсических эффектов при кратковременных аэрозольных воздействиях. Этот тест является основой для классификации и маркировки по параметрам средней летальной концентрации LC_{50}, полученных в острых экспериментах в течение определенного времени для тестирования субстанции по меньшей мере в трех заданных концентрациях. Несколько групп крыс по 10 особей (5 самцов и 5 самок) используются для оценки минимум трех заданных концентраций, по одной концентрации на одну группу. Условия эксперимента должны предусматривать содержание не менее19% кислорода, стабильное атмосферное давление и 12–15-кратный воздухообмен в час. Животных наблюдают ежедневно в течение 14 дней. Особое внимание уделяется изменениям глазных и слизистых оболочек, дыхательной, кровеносной систем, кожи и меха. Остальные процедуры выполняются в соответствии с тестом TG 420.

В токсикологических исследованиях комплексная оценка химических рисков основывается на предположении, что эффект, наблюдаемый на лабораторных животных, будет наблюдаться и у человека.

В соответствии с соглашением между странами-членами OECD в июне 2004 г. предложена *процедура фиксированной дозы* TG 433 как альтернатива оценки острой ингаляционной токсичности по методу TG 403. Различие между TG 403 и новым тестом TG 433 заключается в том, что процедура фиксированной дозы применяется позже со стратегией аналогичной используемой в TG 420. В комбинации с использованием появления симптомов отравления как точки окончания тестирования вместо летального исхода были достигнуты значительные улучшения, касающиеся минимизации страданий животных и уменьшения использования лабораторных животных в эксперименте.

Касаясь достоверности и корректности методов оценки острой токсичности, следует отметить, что субстанции, использование которых может привести к задержке летального исхода, должны быть исследованы по методике TG 425, в которой продолжительность тестирования будет существенно длиннее по сравнению с другими методами тестирования. Однако внутри методов TG 420 и TG 423 нахождение периода задержки летального исхода может потребовать дополнительно более низких уровней доз для практического использования или повторения исследований. Сравнительный статистический анализ показал, что при всех трех методах корректность результатов исследования зависят от выбора уровня стартовой дозы по значениям LD_{50}. Поскольку TG 420 использу-

ет в качестве *точки окончания эксперимента* развитие отравления вместо летального исхода, он не может быть принят в качестве достоверной информация о токсическом эффекте, близком к летальным дозам. Только использование всех трех тестов повысит уровень надежности полученных результатов.

Этические нормы и концепции защиты животных, выдвигаемые в последние 20 лет, так же как и текущие изменения регулирования охраны окружающей среды, делают очевидным необходимость поиска новых подходов. Очевидно, что необходима замена тестов на животных для оценки безопасности химических средств и продуктов на альтернативные.

Новые модели в токсикогеномике и канцерогенезе

Необходимость полной замены животных в тестах моделями систем в области токсикокинетики, метаболизма и зародившейся области токсикогеномики предполагает расшифровку механизмов генотоксичности и мутагенеза, которые должны помочь в развитии подходящих моделей *in vitro*. Прогресс будет зависеть от ряда факторов, таких как развитие тестов *in vitro* в области токсикокинетики и метаболизма, развитие тестов *in vitro* для исследований годности лекарств, дальнейший прогресс в области токсикогеномики. Гибкий подход к тестам *in vivo* уже сегодня может способствовать снижению количества используемых в тестах животных.

Использование линий клеток далеко не всегда соответствует изучаемым *целевым органам*. По этим причинам разрабатывается новая стратегия тестирования, состоящая из четырех стадий. На *стадии 1* оценивается изучаемая субстанция на основе существующих данных и знаний, главным образом, на основе существующей информации об изучаемых токсикантах и химических веществах. На *стадии 2* проводится батарея тестов *in vitro* для определения рисков. *Стадия 3* включает моделирование цели системы *in vitro*, но моделирование проводится в тех ситуациях, когда один или большее число тестов на *стадии 2* дали положительный результат. *Стадия 4* включает тесты на животных, когда один или большее число тестов на *стадии 3* дали положительный результат. *Стадия 2* включает в себя тесты, разрешенные для проведения в регуляторных целях (см. ниже TG 471; TG 480; TG 476; TG 473) и/или оптимизированные тесты *in vitro*. *Стадия 3* должна включать модели целевых органов/систем *in vitro*, которые необходимо развивать и валидировать (эксперты рекомендуют использовать клетки кожи или модели первой стадии исследований для тестирования косметических продуктов. Окончательно *стадия 4* проводится только в тех случаях, когда это необходимо, но тогда она включает в себя тесты *in vivo*.

С 2005 г. осуществляется международный интегрированный проект развития стратегий тестирования *in vitro* для оценки системной острой токсичности препаратов у человека, которые могли бы полностью заменить тесты определения острой токсичности на животных, применяемых в настоящее время с целью систематизации. Проект включает сбор, оценку и разработку данных *in vitro* и *in vivo* для сравнительного анализа; определения таких параметров, как кинетика, метаболизм и токсичность для органов. Целью проекта является установление корреляции между изменениями концентраций веществ *in vitro,* дозами токсичности *in vivo*; описание новых инструментов и клеточных систем для определения диапазона эксперимента, стратегий для предварительного определения и имитационного моделирования острой токсичности у животных и человека (Таблица 53).

Таблица 53

РЕКОМЕНДАЦИИ OECD TG ДЛЯ ТОКСИКОГЕНОМНЫХ ТЕСТОВ

TG	Наименование и комментарий
471	Тест на профиль бактериальных мутаций. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Тест *in vitro* для точек мутаций.[a] Альтернативный тест как часть общей стратегии тестирования.
472	Токсикогеномика: Escherichia coli. Исследование не было валидировано. Принят 26.05.1983. Дата исключения 21.07.1997, метод поглощен TG 471.
473	Тест аберрации хромосом млекопитающих *in vitro*. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Альтернативный тест, часть батареи тестов; он не полностью замещает тесты *in vitro*.
474 ТнЖЬ	Тест микронуклеусов эритроцитов млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Снижено количество животных по сравнению с версией 1983 г., используется меньше животных.
475 ТнЖ	Тест аберрации хромосом костного мозга млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997.
476 ТнЖ	Тест мутации генов клеток млекопитающих *in vitro*. Принят 04.04.1984. Подтвержден 21.07.1997.
477	Токсикогеномика: тест на летальность рецессивного гена пола у Drosophilia melanogaster. Принят 04.04.1984. Альтернативный тест, так как мухи являются беспозвоночными. Замечание: Directive 86/609/EEC определяет животных как любое живое нечеловекообразное позвоночное.
478 ТнЖ	Токсикогеномика: тест на летальность доминант грызунов. Принят 04.04.1984.
479	Токсикогеномика: исследование *in vitro* сестринских хроматоидных изменений в клетках млекопитающих. Принят 23.10.1986. Тест *in vitro* изменений ДНК между сестринскими хроматидами, определение генетической токсичности.[a] Альтернативный тест является частью общей стратегии тестирования

480	Генетическая токсикология: Saccharomyces cerevisiae. Исследование генной мутации. Принят 23.10.1986. Тест *in vitro* генной мутации Saccharomyces.a Альтернативный тест является частью стратегии тестирования.
481	Токсикогеномика: Saccharomyces cerevisiae. Исследование митотических рекомбинаций. Принят 23.10.1986. Тест на генотоксичность in vitro митотических рекомбинаций у Saccharomyces.[a] Альтернативный тест является частью общей стратегии тестирования.
482	Токсикогеномика: повреждение и исправление ДНК, неописанный синтез ДНК в клетках млекопитающих *in vitro*. Принят 23.10.1986. Альтернативный тест является частью батареи тестов, он не полностью заменяет тест *in vitro*.
483 ТнЖ	Тест сперматогониальной аберрации хромосом млекопитающих. Принят 23.10.1986. Подтвержден 21.07.1997.
484 ТнЖ	Токсикогеномика: тест мышиного пятна. Принят 23.10.1986.
485 ТнЖ	Токсигеномика: тест наследования транслокации у мышей. Принят 23.10.1986.
486 ТнЖ	Тест неописанного синтеза ДНК на клетках печени млекопитающих *in vitro*. Принят 21.07.1997.
487	Тест микронуклеусов *in vitro*. Планируется в новом руководстве. Альтернативный тест является частью батареи тестов; не полностью заменяет тест in vivo.

[a] *Все тесты in vivo генетической токсикологии являются частью стратегии тестирования, которая проводится на животных только в случае необходимости (в случае полученных двусмысленных результатов).*
[b] *– ТнЖ = тест на животных.*

Альтернативные модели гено- и эмбриотоксичности

Специальным соглашением по использованию тестов *in vitro* для оценки генотоксичности в перечень исследовательских методов были включены тесты Ames / бактериальной противоположной мутации, так же как и тесты *in vitro* для хромосомной аберрации, мутации генов клеток и изменений в сестринских хроматидах (OECD TG 471, 473, 476 и 479 соответственно. Использование этих приемов, самих по себе или в комбинации, дает высокочувствительные тесты определения генетической токсичности (11–12). Научные и этические соглашения по использованию методов *in vitro* для нахождения точки окончания эксперимента, тесты на определение генетической токсичности *in vivo* послужили отправной точкой для валидации.

В соответствии с рекомендациями Агентства по защите окружающей среды США (EPA – Environmental Protection Agency) были предложены тесты по оценке острой токсичности на рыбах, икре рыб, *in silico*. ECVAM *валидировала* использование эмбриональных стволовых клеток для эмбриотоксичности, а также использования культуральных клеток животных и человека.

Тесты на организмах, живущих в воде

Существует тест ECOSAR (Ecological structure-activity relationships) в моделях *in silico* при определении химической токсичности для организмов, живущих в воде, рекомендован к использованию в программе HPV руководством EPA. Модель дает возможность предсказать эффекты ряда таксономических групп, включая рыб, беспозвоночных и водоросли, при изучении как острой, так и хронической токсичности лекарственных средств.

Другое обещающее исследование *in vitro* – исследование икры рыб, которое показывает очень ранние стадии развития эмбриона при концентрациях изучаемой субстанции. Этот тест используется в настоящее время в Германии как замещающий рыб тест при оценке загрязнения воды и может быть признан замещающим тестом во всех случаях использования рыб в тестах на острую токсичность лекарств.

Тест эмбриональных стволовых клеток (EST)

Тест EST валидирован ECVAM для выявления эмбриотоксичности. Он определяет критические параметры и наличие развивающейся токсичности. Тест использует стволовые клетки крыс, которые помещены в культуру и обладают способностью к дифференцированию. Эмбриотоксичность определяется по концентрации тестируемых химических веществ, необходимых для подавления 50% дифференциации, вместе с ростом ингибиции на 50% относительно контроля. Этот валидированный тест идеально подходит для немедленного использования как меры уменьшения на основном, скрининговом уровне программы типа EPA's HPV Challenge, где химические вещества, которые получили положительную оценку в тесте на эмбриотоксичность, должны быть классифицированы как вероятно развивающие токсичность, без продолжения тестирования другими методами. Несмотря на то, что метод признан снижающим использование животных ввиду его высокого потенциала, который может спасти жизнь более чем 30% животных, используемым в обычных пренатальных определениях развивающейся токсичности, в соответствии с OECD 414 – EPA и другие участвующие компании пока отказались использовать этот тест в программе HPV.

Клеточные линии человека и животных

Предлагаются методы оценки острой системной токсичности *in vitro*, включающие два основных метода определения цитотоксичности с ис-

пользованием обычных кератиноцитов человека *NHK* и клеточных линий фибробластов мышей *BALb/c 3T3*. Эти тесты являются наиболее подходящими для немедленного использования как снижающая мера для вычисления стартовой дозы *in vivo*. Предполагается, что вследствие этого возможно снижение использования животных на 40%. EPA также рекомендует участникам программы включать данный метод в программы определения острой токсичности. Тем не менее, исследователи часто игнорируют рекомендованные методы определения острой цитотоксичности методами *in vitro*, когда в тестах используют нетоксичные материалы и вещества.

Альтернативные батареи тестов

Одной из основных проблем альтернативного моделирования является выбор правильной стратегии тестирования для новых химических веществ и инновационных лекарств, по которым еще нет данных о потенциальной токсичности их молекул. Только некоторые исследования вносят новые данные в проблему поиска и валидации общепринятых методов. Исследования *in vitro* позволят сформировать общую стратегию тестирования. Для этого необходима новая техника использования культур клеток, которая обеспечит уровень функционирования системы или органа в целом, что позволит вычленить в *in vitro*-моделях функциональные свойства *in vivo*-органа в целостном организме. Общепринятым подходом является использование нескольких параллельных исследований на клеточных культурах, которые условились обозначать как *батарею тестов*.

Батарея тестов (test battery) представляет собой мультиметодическое использование серии тестов, проводимых обычно в одно и то же время или в тесной связи друг с другом. Каждый тест внутри последовательности строится для получения дополнительной информации от предыдущего и для измерения различий дополнительного многофакторного токсического эффекта.

Определение максимально толерантной дозы *in vitro* осуществляется на основе определения минимальной концентрации лекарств *in vitro*, которое приводит к изменениям в клеточной морфологии. Лактатдегидрогеназа (LDH) уменьшает или повышает до 50% смертность клеток (CT_{50}), что предполагает соответствие этой дозы лекарств дозе *in vivo*. Она дает повышение до первоначальных или слабых проявлений токсичности, т.е. до тех пор, пока минимальная концентрация лекарств *in vitro* не приведет к гибели более 90% клеток (CT_{100}) и не будет соответствовать дозе *in vivo*, которая в свою очередь дает повышение маркированных клинических показателей. Значения CT_{50} и CT_{100} (мг/мл) трансформируются в мг/кг/сут для порога *in vivo*.

Следует подчеркнуть, что первичные культуры гепатоцитов крысы более чувствительны, чем многие другие типы клеток. Они используются для прогнозирования значений *in vivo* у собак. Клетки MDBK (почки крупного рогатого скота, телят) менее чувствительны и используются для получения прогнозируемых данных *in vivo* у крыс. Клетки McCoy эпителия человека служат в качестве контроля *in vitro*. Такие параметры роста и морфологии, как площадь поверхности, занятая растущими линиями клеток, изменения в размерах и форме клеток, наличие цитоплазматических вакуолей, деление клеток, мертвые и умирающие клетки, учитываются после экспозиции для гепатоцитов – 24 часа, для остальных клеточных линий – 24, 48 и 72 часа. Ниже мы приводим некоторые наиболее распространенные батареи тестов для альтернативного моделирования *острой токсичности*.

Тест А Hep G2 cell/protein content основан на использовании линии клеток гепатомы для тестирования субстанций. Цитотоксичность измеряется как изменение содержания белка по методу, описанному Lowry и др. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами **B-D** (см. ниже) или в комбинации только с тестом **B** для уменьшения количества животных в опытах по изучению острой токсичности при применении препаратов *per os*.

Статус валидации оценен в Multicentre Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity (MEIC – мультицентр по оценке цитотоксичности *in vitro*) по *релевантности цитотоксичности* тестов *in vitro* для оценки острой токсичности у человека. Результаты MEIC показали соответствие тестов, проведенных на клеточных культурах человека для определения базальной цитотоксичности. В батарею тестов для улучшения общих результатов моделирования должны быть включены два вида тестов: тесты *in vitro*, имеющие соответствие по токсикокинетике, и тесты *in vitro*, целью которых является определение токсичности для органов. Тесты были разработаны для оценки летальных концентраций в крови человека и их, в противовес концентрации в крови, необходимо комбинировать с данными по поглощению в соответствии с предполагаемыми проверяемыми дозами. Тест осуществляется в течение 24 часов.

Тест В HL-60/АТФ content основан на использовании указанных клеток острой миелолейкемии человека для тестирования субстанций. Содержание АТФ измеряют с помощью Lucifer-LU плюс оборудование для биолюминисценции из энзимной люцеферин-люцеферазной реакции. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами **A, C** и **D** (см. ниже) или в комбинации только с тестом **A**. Тест разработан

и оценен по программе MEIC для определения летальной концентрации в крови человека. Результаты, в противовес концентрациям в крови, должны быть рассмотрены в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз. Тест осуществляется в течение 24 часов.

Chang liver cell-тест **C** основан на использовании клеток печени Chang'а, культивированных в запечатанных парафином чашках с 96 ячейками для микротитрования. Недостаток развития веретенообразных или веретеновидных клеток является критерием цитоингибирования. Культуры затем культивируются в течение 7 дней и используются в тесте **D**. Оценен по программе MEIC для использования в батареях тестов **A, B** и **D**. Тест разработан для оценки летальной концентрации в крови человека. Результаты должны быть рассмотрены в противовес концентрациям в крови в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз.

Тест D Chang cell/pH основан на использовании культуры из теста **C**. Через 168 часов цвет pH индикатора фенол красный, включенного в среду, записан. Фиолетовый цвет является показателем *полного ингибирования*, в то время как наличие небольшого количества основного красного, как и не являющегося нормальным оранжевого цвета говорят о *частичном ингибировании*. Используется в батареях тестов **A, B** и **C**.

Тест E BALB/c 3T3 (NRU) используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках указанной линии мышей для испытания выживания и жизнеспособности, определяемой по способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (*NRU*). NR аккумулируется в лизосомах. Изменения поверхности клетки является результатом снижения поглощения и связывания NR. Тест валидирован и широко распространен. Тест является альтернативой использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os*.

Тест F NRU на *линии человеческих кератиноцитов* используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках человека по показателям выживания и жизнеспособности, определяемой по способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (*NRU*). NR аккумулируется в лизосомах. Тест валидирован, широко распространен и является альтернативой использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os*. Тест осуществляется в течение 48 часов.

Новые стратегии сочетания животных и альтернативных моделей

На данном этапе развития научных исследований оценка хронической токсичности и ее разновидностей возможна *исключительно с использованием животных*.

Токсикологический и канцерогенный потенциал химических веществ обычно определяют в последовательности экспериментов: *токсичность острую, подострую* (14 дней), *субхроническую* (90 дней) и *хроническую* (2 года) — на крысах и мышах обоих полов. В разных странах существуют требования проверки хронической токсичности на более крупных животных (кролики, кошки, собаки, мини-свиньи).

Общепринято, что уровни доз для 14-дневного эксперимента по токсичности обычно оцениваются по данным литературных источников, если такие существуют. Информация о токсичности из 14-дневного эксперимента используется для выбора доз для 90-дневного опыта. Протокол 14-дневного эксперимента включает 5 доз и контрольные группы, по 5 животных в группе каждого пола и вида. Всего используют 120 животных на опыт.

В настоящее время в дополнение к очистке текущих протоколов тестирования оцениваются потенциальные методы тестирования *in vitro* для частичного или полного отказа от 14-дневных изучений токсичности, особенно для химических веществ, где используется процедура нанесения на кожу. В исследовании *in vitro* с использованием EpiDerm™ для оценки раздражения кожи используют нейтральный красный NRU для оценки системной токсичности и используют цитотоксичность на первичных гепатоцитах крыс для оценки гепатотоксичности. Обычно тесты EpiDerm и NRU дают хорошую оценку, соответствующую тестам *in vivo*. Однако необходимо большое количество баз данных для принятия окончательного решения соответствия результатов *in vitro* результатам *in vivo*.

Модели хронической токсичности — это основы оценки функциональных и морфологических нарушений у экспериментальных животных при применении веществ от 6 до 12–18 месяцев.

Более полно хроническую токсичность можно определить как *последовательность дисфункций* или прогрессивно ухудшающихся функций клеток, органов или систем множественных органов в результате длительного воздействия химических веществ. Предложены реперные точки эксперимента и разрабатывается интегрированный подход к тестированию, основанный на альтернативных методах при наличии моделей *in vitro*. Определены пять наиболее общих мишеней токсичности для оцен-

ки повторяющихся доз: *печень, почки, ЦНС, легкие и гематопоэтическая система.*

Разработанные методы используются сегодня на всех исследовательских уровнях, но ни один не может быть назван не только идеальным, но хотя бы приемлемым для оценки цели любой токсичности для органов. Необходимо предпринять попытки оптимизировать существующие модели и найти соответствующие модели *in vitro* в тех случаях, когда имеется несколько моделей, например для легких, печени и так далее. В общем случае рекомендуется провести дополнительное исследование для обеспечения лучшего понимания патогенезиса хронических болезней.

Необходимы дополнительные попытки для оценки NOEL (No observable adverse effect level) отсутствия у рассмотренных уровней побочных эффектов *in vitro*. Требуется большое число исследований и подтверждений оценок применения подходов моделей QSAR для установления хронической токсичности и для включения их в *батарею тестов* и *стратегию рядов*. Для валидации существующих и вновь разработанных альтернативных моделей понадобится, по-видимому, не менее 10 лет, а достижение *полной замены животных* в регулярных тестах и стратегиях зависит от уровня исследований, адекватной расстановки приоритетов, попыток установления и координации действий ученых разных стран.

Глава 17

Аллометрические соотношения человека и животных и экстраполяция результатов

Понятие биомоделирования предполагает существование двух объектов — модели и прототипа, т.е. животного и человека. Исследование одного дает возможность делать выводы о другом. Логическими основаниями метода биомоделирования могут служить любые выводы, в которых биологические посылки относятся к одному объекту, а научное заключение — к другому.

Поскольку суть экспериментальных исследований состоит в изучении наиболее общих закономерностей изменений в организме человека под влиянием внутренних процессов и факторов среды, необходимы, безусловно, корректные подходы, пути и методы экстраполяции и переноса данных с биообъектов, будь то животные или тест-системы. Следует всегда помнить, что механизмы работы клеток в сложных системах животных-макроорганизмах, в клеточных культурах и одноклеточных организмах могут быть столь различны, что речь будет идти уже не о количественных различиях, а об иных качественных особенностях и существенно иных закономерностях.

Возникает вполне закономерный вопрос: а как далеко может простираться понятие аллометрии и может ли оно быть применено в отношении альтернативных моделей II порядка.

Аллометрия (allos — греч. — другой, иной) — это сравнительные измерения разных видов живых организмов по каким-то общим признакам. Аллометрия включает не только и не столько взаимные измерения, а, прежде всего, установление сходства морфофункциональных характеристик и иных важнейших параметров в целях экстраполяции.

Аллометрия как основа экстраполяции

Аллометрические уравнения являются выражением регрессии, которое описывает вариацию одного параметра в зависимости от другого, обычно от веса тела. Есть несколько видов уравнений регрессии (т.е. линейная регрессия, основная ось и снижение от основной оси), и, если корреляция *p* от *W* не слишком велика, найденные величины градиента и отрезок, отсекаемый на оси у, будут зависеть от выбранного метода для нахождения регрессии. Аллометрическое уравнение зависит от способа выбранного для их нахождения, так как оно является статистической аппроксимацией, а не функциональной математической зависимостью.

Хотя математические модели уже давно и успешно используются в биологии и медицине, проблемы оптимизации и систематизации таких моделей, оценки их эвристической значимости, определения граничных условий применения в конкретных условиях нуждаются в дальнейших исследованиях и интерпретациях.

Важнейшее значение для интерпретации экспериментов, проведенных на животных с учетом размера тела и основных физиологических показателей различных видов млекопитающих, позволяет делать некоторые заключения относительно характеристик организма человека и его функций.

Важными в этом отношении являются такие показатели, как интенсивность метаболизма, анатомия, частота сердечных сокращений и химия организма. Существуют впечатляющие корреляции этих показателей с размерами организма.

Одним из таких показателей, как мы уже указывали, является использование в фармакологии и токсикологии *единицы удельной поверхности* тела млекопитающих. Как это ни странно, но мы все с паранойяльным упрямством рассчитываем *ED, MD, LD, CD* в мг/кг, а не в мг/см^2. В то же время многочисленные данные для огромного количества лекарств и ксенобиотиков показывают, что если равноэффективные дозы для человека и животных различаются в разы по соотношению поверхности тела, то по соотношению массы тела – в сотни и тысячи раз.

В Таблице 59 представлены основные параметры сравнительных характеристик человека и крупных лабораторных животных. Эти данные не позволяют оценить функциональные связи модели и прототипа. В Таблице 60 представлены биохимические показатели крови человека и животных, они характеризуют динамику процесса, в отличие от данных предыдущей таблицы, представляющих собой статичные измерения.

Каждый из параметров Таблицы 61 может быть соотнесен в динамике с другими показателями крови, частоты пульса или дыхательных

Таблица 54

ОСНОВНЫЕ СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЧЕЛОВЕКА И КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Показатель	Человек	Мини-свинья	Овца	Собака	Кошка
Масса тела, кг	70	37,3	95	12	3
Площадь поверхности тела, см	18000	8750	9000	5820	2466
to тела, t°C	37,2 (рект.) 36,6 (кожа)	39	38,5–40	38,5	38–39,5
Пульс, уд./мин.	60–70	80	70-80	70–130	110–140
Частота дыхательных движений	20	15–20	12-15	14–26	10–20
Продолжительность жизни, лет	75	15 и более	9-15	10–15	14–20
Масса внутренних органов в процентах от массы тела					
Головной мозг	1,9	0,24	0,11	1–2,7	0,7–1,1
Печень	2,14–2,43	1,79	0,66–1	3	3,11
Сердце	0,36–0,47	0,3–0,4	0,24–0,25	0,69–1,3	0,39
Почки	0,4–0,57	0,66	0,06–0,1	0,5–0,7	0,34
Легкие	0,53	0,56	0,23–0,41	1,1–1,66	0,62
Поджелудочная железа	0,06–0,17	0,11–0,15	0,01-0,08	0,13–0,35	0,15–0,28
Селезенка	0,21–0,28	0,13	0,13–0,17	0,08–0,4	0,2

Таблица 55

ОСНОВНЫЕ СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Показатель	Человек	Мини-свинья	Овца	Собака	Кошка
Гемоглобин, г/дл	11,5–14,5 (ж) 13,2–16,4 (м)	16,0–16,8	10–15	11–18	12,9
Гематокрит, %	36–42 (ж) 40–48 (м)	43,1	32,4	50,4	35–40
Эритроциты, млн в мм^3	3,7–4–7 (ж) 4–5,1 (м)	5–8	10,03	5,5–8	7,34
Лейкоциты, тыс. мм^3	4–8,8	15–20	8–10	8–18	15,1
Лимфоциты, %	19–37	18,7–61,7	47–70	13–32	23
Моноциты, %	3–11	0,3–4	1–5	0–0,3	2
Нейтрофилы, %	48–78	32–78,7	20–45	60–82	65–69
Эозинофилы, %	0,5–5	0,0–6,0	2–15	2–4	5–7
Базофилы, %	0–1	0–1,3	0–1	0–2	0–2
Билирубин, мг/%	0,5–1,2	0,2–1,1	0,3–1,8	0–0,5	2–4
Глюкоза, мг/дл	60–100	80–110	18–57	60–87	39–61
Креатинин, мг/дл	0,5–1,5	0,5–1,37	0,7–1,8	0,3–1,0	50–110
Тромбоциты, тыс/мм^3	180–320	200–500	150–250	200–600	285–500

движений и даже прокоррелированы с изменениями продолжительности жизни животных и человека.

При установлении зависимостей физиологических или биохимических параметров от какого-либо фактора воздействия помимо учета уровня основного обмена следует учитывать изменения в динамических системах (Таблица 62) животных.

Таблица 56

МЕЖВИДОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Параметр и его размерность	Человек	Собака	Крыса	Мышь
Продолжительность жизни, лет	63,4 (1,0)	15,8 (0,25)	3,7 (0,06)	2,3 (0,04)
Масса скелета, г	10100 (1,0)	4000 (0,40)	12 (0,012)	1,1 (0,0001)
Масса тела, г	70000 (1,0)	7000 (0,10)	200 (0,0029)	20 (0,0003)
Объем крови, мл	3500 (1,0)	350 (0,10)	10 (0,0029)	1 (0,0003)
Индекс цефализации	19,3 (1,0)	9,0 (0,47)	2,7 (0,14)	2,7 (0,14)
Поверхность тела, см^2	18110 (1,0)	4890 (0,27)	291 (0,016)	73,3 (0,004)
Интенсивность метаболизма, кал/г×ч	0,25 (1,0)	0,3 (1,20)	0,75 (3,00)	0,75 (30,0)
Основной обмен, ккал×кг/сут.	25 (1,0)	36 (1,40)	100 (4,00)	160 (6,40)
Водный обмен	10,0 (1,0)	5,0 (0,50)	2,5 (0,30)	1,6 (0,20)
Скорость потребления кислорода, мл/мин	234,4 (1,0)	158,5 (0,68)	20,0 (0,085)	1,0 (0,004)
Объем легких, мл	6300 (1,0)	1780 (0,28)	12,0 (0,0019)	1,2 (0,0002)
Площадь альвеол, см^2	0,62*106 (1,0)	0,5*106 (0,81)	5600 (0,009)	630 (0.0010)
Эффект Бора	0,59 (1,0)	0,69 (1,20)	0,86 (1,50)	0,95 (1,60)
Период кровотока, с	23 (1,0)	17 (0,70)	8 (0,30)	6 (0,30)
Частота дыхания в минуту	18 (1,0)	20 (1,10)	80 (0,40)	210 (11,07)
Число капилляров в бедренной мышце на 1 см^2	290 (1,0)	360 (1,20)	520 (1,80)	1000 (3,40)
Легочная вентиляция, см^3/мин	8732 (1,0)	2500 (0,29)	73 (0,008)	25 (0,003)

Таблица 57

АЛЛОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НЕКОТОРЫХ ПРОЦЕССОВ ОСНОВНОГО ОБМЕНА

Показатель	Мышь	Крыса	Кролик	Собака	Мини-свинья	Овца	Человек
Потребление O_2, см^3/г массы тела/ч	1,70 (8,1)	0,88 (4,2)	0,55 (2,6)	0,36 (1,7)	0,35 (1,67)	0,25 (1,19)	0,21 (1,0)
Ректальная температура, °С	38,0 (1,01)	38,1 (1,02)	39,2-39,6 (1,05)	38,3-39,0 (1,03)	39,0 (1,04)	39,5 (1,05)	37,2-37,8 (1,0)
Суммарный объем митохондрий в клетке печени, % от V клетки	16,93 (1,28)	18,38 (1,39)	11,46 (0,87)	10,7 –	12,8 –	11,6 –	13,22 (1,0)
Число мальпигиевых телец в почках на 1 г массы тела	670 (24,8)	123 (4,6)	188 (7,0)	50 (1,9)	29 –	21 –	27 (1,0)
Количество мочи на 1 кг массы тела, см^3/сут	–	–	16-18-	40 (2,2)	40 (2,2)	10-15 (0,7)	14-23 (1,0)

Таблица 58

АЛЛОМЕТРИЧЕСКИЕ СООТНОШЕНИЯ НЕКОТОРЫХ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Показатель	Мышь	Крыса	Морская свинка	Кролик	Собака	Мини-свинья	Овца	Человек
Период полувыведения белков плазмы крови, сут.	0,08	0,2	0,2	0,25	0,35	0,65	0,5	1,0
Период полувыведения альбуминов плазмы крови, сут.	0,06	0,25	0,3	0,33	0,35	0,71	0,55	1,0
Сахар мг%	0,82	1,41	1,48	1,18	1,18			1,0
Холестерин, мг%	0,77	0,33	0,29	0,47	0,89			1,0
Общий белок сыворотки, гр%	0,91	0,97	0,95	1,15	1,03	1,13	1,0	1,0
Белковые фракции: альбумины, %	0,53	0,83	0,9	0,99	0,87	0,77	0,69	1,0
глобулины, %	0,45	0,7	0,9	0,3	0,3	0,5	0,5	1,0
Сумма α,β,%	0,79	0,82	0,42	0,47	1,04	0,85	0,43	1,0
γ-глобулин %	0,63	0,5	1,04	1,23	0,74	1,23	1,91	1,0
Остаточный азот, мг%	3,07	2,27	2,67	2,47	1,73	2,13	1,87	1,0

Таблица 59

АЛЛОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ, ОПИСЫВАЮЩИЕ МЕЖВИДОВЫЕ ВАРИАЦИИ ПЕРИОДОВ ПОЛУВЫВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ*

Препарат	Число видов животных	Коэффициент корреляции	Аллометрический коэффициент	Аллометрическая экспонента
Метотрексат	5	0,994 (p<0,01)	54,6	0,228
Циклофосфамид	6	0,752 (p<0,01)	36,6	0,236
Антипирин	10	0,503 (p<0,01)	74,5	0,269
Дигоксин	5	0,941 (p<0,05)	983	0,234
Гексобарбитал	5	0,912 (p<0,05)	80,0	0,348
Фенилбутазон	7	0,335 (p<0,5)	340	0,2613
Анилин	5	0,650 (p<0,3)	62,2	0,176
Диазепам	4	0,989 (p<0,05)	122	0,428
Среднее:				0,222

** Примечание. Периоды полувыведения использованы в минутах, вес тела в килограммах. Взяты только те данные, которые соответствуют не менее чем 4 видам. Данные по человеку были исключены из анализа.*

Таблица 60

АБСОЛЮТНЫЕ И ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ СООТНОШЕНИЯ МАСС ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ У ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Орган	Мышь	Крыса	Морская свинка	Кролик	Собака	Человек
Мозг	1,3 (0,7)	0,6 (0,3)	0,64 (0,3)	0,35 (0,2)	0,6 (0,6)	2,0 (1,0)
Гипофиз	0,004 (15,6)	0,005 (19,4)	0,005 (19,4)	0,0016 (6,2)	0,0006 (2,3)	0,00026 (1,0)
Надпочечники	0,009 (0,45)	0,0099 (0,5)	0,03 (1,5)	0,023 (1,2)	0,001 (0,1)	0,02 (1,0)
Щитовидная железа	0,2 (7,0)	0,012 (0,4)	0,16 (5,6)	0,008 (0,3)	0,02 (0,7)	0,03 (1,0)
Поджелудочная железа	0,6 (10,5)	0,23 (4,0)	0,38 (6,7)	0,12 (2,1)	0,24 (4,2)	0,06 (1,0)
Селезенка	0,7 (2,7)	0,45 (1,8)	0,65 (2,5)	0,45 (1,8)	0,4 (1,6)	0,26 (1,0)
Печень	4,5 (1,8)	2,3 (0,9)	4,1 (1,6)	3,85 (1,5)	2,7 (1,1)	2,6 (1,0)
Почки	0,7 (1,6)	0,55 (1,2)	1,1 (2,5)	0,73 (1,6)	0,7 (1,6)	0,4 (1,0)
Кишечник	3,7 (2,2)	3,0 (1,8)	2,8	5,7 (3,3)	3,5 (2,0)	1,7 (1,0)
Сердце	0,5 (1,1)	0,5 (1,1)	0,46 (1,0)	0,25 (0,5)	0,8 (1,7)	0,47 (1,0)
Кровь	6,5 (0,8)	7 (0,9)	7 (0,9)	6,5 (0,8)	7 (0,9)	7,9 (1,0)
Легкие		1,25 (0,9)	0,76 (0,5)	0,55 (0,4)	0,7 (0,5)	1,43 (1,0)
Мышцы	45 (1,1)	45 (1,1)	45 (1,1)	50 (1,3)	35 (0,9)	40 (1,0)
Костный мозг	4 (0,93)	3 (0,7)	4 (0,93)	4 (0,93)	3 (0,7)	4,3 (1,0)
Скелет	10 (0,7)	10 (0,7)	10 (0,7)	10 (0,7)	10 (0,7)	14,3 (1,0)

Таблица 61

АЛЛОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ, ОПИСЫВАЮЩИЕ ВРЕМЕНА ОБОРОТА ИЛИ СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ОЦЕНКИ ДЛЯ ЭНДОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ ИЛИ ПРОЦЕССОВ*

Субстанция	Количество видов	Коэффициент корреляции (значимость)	Аллометрический коэффициент	Аллометрическая экспонента
Сывороточный альбумин	6	0,993 (p<0,01)	5,68	0,296
Общее содержание воды в организме	8	0,940 (p<0,01)	6,01	0,161
Эритроциты	11	0,778 (p<0,01)	68,40	0,102
Сердечное кровообращение	11-12	-	0,422	0,21
Среднее				0,192

** Примечание. Параметр B – в аллометрических уравнениях имеет размерность – кг. Время оборота – в днях, вес тела – в кг. Время оборота аппроксимировалось как $1,44t_{1/2}$. Общее содержание воды в организме делили на величину суточной скорости экскреции воды с мочой, чтобы получить оценку времени оборота. Среднее время прохождения крови по сосудистой системе оценивается из двух аллометрических уравнений, объем крови как функция веса тела, деленная на сердечный выброс (как функцию веса тела). Время оборота (или время прохождения) – в минутах.*

Таблица 62

ДАННЫЕ О ВЕСЕ МОЗГА, ВЕСЕ ТЕЛА И МАКСИМАЛЬНО ВОЗМОЖНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ЖИЗНИ

Животные и человек	Вес взрослого организма (г)	Вес взрослого мозга	Вес мозга (% от веса тела)	Вычисления МПЖ (в годах)
Мышь	23	0,334	1,45	2,67
Крыса	250	1,88	0,751	4,68
Морская свинка	270	3,42	1,27	6,72
Кролик	2550	9,97	1,391	8,01

Собака	14200	75,4	0,531	19,7
Свинья	77200	58,2	0,072	11.,4
Овца	57600	110	0,191	18,3
Коза	31300	130	0,416	23,3
Крупный рогатый скот	31000	252	0,081	21,2
Макака-резус	4700	62	1,32	22,3
Человек	70000	1530	2,19	93,4

Учет этих параметров исключительно важен в токсикофармакокинетике. Скорость метаболизма изменяется пропорционально массе тела в степени 0,75. Наличие такой закономерности имеет важные последствия для анатомического строения и химии крови.

Прогнозирование дозопереноса

Аллометрия может быть полезной в вопросах, когда надо избежать использования животных в эксперименте. Это также может быть сильным средством для предсказания относительности гуманности, осторожности и состояния животных-моделей, когда специфические данные для видов отсутствуют; например, в прогнозах режима доз для некоторых лекарств, по которым есть фармакодинамические преимущества, но нет фармакокинетических измерений по данному виду животных. Аллометрия также дает логический подход к временному масштабу распределения экспериментальных процедур или их последовательности, которые могут быть полезны, обеспечивая внутри этого аспекта строгость за счет сравнения экспериментальных данных с другими видами и человеком.

Таблица 63

ПРИМЕРНЫЕ СООТВЕТСТВИЯ ДОЗОПЕРЕНОСА

Биообъект	Мышь, 20 г	Крыса, 200 г	Морская свинка, 400 г.	Кролик, 1,5 кг	Кошка, 2 кг	Обезьяна, 4 кг	Собака, 12 кг	Мини-свинья, 40 кг	Человек, 70 кг
Мышь, 20 г	1	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	221,7	387,9
Крыса, 200 г	0,14	1	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	37,7	66,0
Морская свинка, 400 г	0,08	0,75	1	2,25	2,4	5,2	10,2	17,8	31,2
Кролик, 1,5 кг	0,01	0,25	0,44	1	1,08	2,4	4,5	8,1	14,2
Кошка, 2 кг	0,03	0,23	0,41	0,92	1	2,2	4,1	7,4	13,0
Обезьяна, 4 кг	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1	1,9	4,6	8,1
Собака, 12 кг	0,008	0,06	0,1	0,22	0,24	0,52	1	1,77	3,1
Мини-свинья, 40 кг	0,0015	0,01	0,018	0,04	0,034	0,09	0,18	1	1,77
Человек, 70 кг	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,31	1,03	1

Надо помнить, что построенная по расчетным параметрам удельной поверхности тела человека и животных, т.е. наиболее представительная отражающая всеобщую аллометрическую закономерность не только для животного, но и растительного мира, тем не менее, не может быть принята за абсолют. Эффекты и дозовые характеристики будут меняться в зависимости от сезона, климато-географических условий, условий содержания и других переменных.

Сравнительные морфофункциональные особенности экспериментальных животных

Средние и крупные подопытные животные в экспериментах используются для подтверждения и уточнения результатов исследований, полученных в опытах на имитаторах живых тканей. При экстраполяции результатов, полученных на животных, необходимо учитывать физиологические и анатомические особенности используемых в эксперименте биообъектов. Подробно они изложены в монографиях Н.Н.Каркищенко «Основы биомоделирования» (2004 г.) и «Альтернативы биомедицины» (2007 г.) и ряде других работ. Однако здесь мы подчеркнем некоторые важные для экспериментатора моменты.

Особенности кожного покрова. У *собаки* тонкая, легкоподвижная кожа. Незначительная травма ведет к отрыву больших участков кожи с образованием глубоких мешковидных полостей.

Кожа *свиньи* имеет умеренно развитый волосяной покров, самая толстая кожа в области спины и крупа, самая тонкая – на брюшной стенке.

Особенности центральной нервной системы. У *кошек* головной мозг тяжелее спинного в три–четыре раза, а вес спинного мозга у животных средней величины – 7,5 г. Полушария головного мозга несколько округленной формы. Обонятельные луковицы развиты в меньшей степени, чем у собак. Борозд и извилин мало, идут они преимущественно продольно.

Центральная нервная система *кролика* характеризуется примитивностью строения, так как слабо развита кора полушарий головного мозга. Полушария небольших размеров, сужены кпереди, не имеют борозд и извилин.

Наружная поверхность мозговых полушарий *морских свинок* разделяется на четыре доли: лобную, теменную, височную и затылочную. Кора больших полушарий головного мозга морских свинок не имеет выраженных извилин, а лишь неровности, поэтому эти животные относятся к группе гладкомозговых. Имеются четыре продольные борозды примитивного типа: ринальные передняя и задняя, гипокампова и борозда мозолистого тела. Кроме них, имеются еще сильвиева, носовая и каудальная борозды. Поверхность большого мозга разделена сильвиевой бороздой на переднюю (лобно-теменную) и заднюю (височно-затылочную) области.

Полушария переднего мозга взрослой *крысы* гладкие. Обонятельные доли большие. Строение головного и спинного мозга, отхождение черепно-мозговых и спинных нервов принципиально такие же, как и у других млекопитающих.

Особенности зрения. Зрение у *кошек* хорошо развито. На сетчатке глаза много палочек, особенно большое количество их сконцентрировано в центральной ямке. Острота ночного зрения у кошки в *четыре раза больше*, чем у человека, но дневное зрение у кошек в *пять раз хуже* дневного зрения людей. Восприятие кошками цветов подтверждается электрофизическими исследованиями.

Зрение у *кролика* монокулярное. Глаза кролика позволяют осматривать все вокруг, поскольку поле зрения правого и левого глаза наслаивается спереди на 27° и сзади – на 9°. Глазное яблоко у *кролика* больших размеров и имеет такое же строение, как и у других животных. Глаз кролика имеет три века – верхнее, нижнее и третье, расположенное во внутреннем углу глаза. Под третьим веком находится железа третьего века, которая по характеру секрета относится к сальным железам. Слезный аппарат представлен слезной железой, расположенной в височном углу глаза. Глазодвигательные мышцы: четыре прямых, две косых и оттягиватель глазного яблока.

Особенности иммунной системы. *Тимус* у человека и млекопитающих – это дольчатый орган, сильно развитый лишь у эмбрионов и в первые годы жизни; затем он постепенно исчезает и у взрослых особей большей частью совсем отсутствует. Развитый тимус находится в области шеи и трахеи, а главным образом в краниальном отделе грудной полости. Этот расположенный за грудиной орган вырабатывает ряд пептидов.

Поскольку тимус *телят* является излюбленной моделью в иммунологических и эндокринологических экспериментах, следует напомнить, что у них он относительно большой и следы его часто остаются надолго в грудной полости. У молодых телят он состоит из большой непарной грудной доли и парных шейных частей, выступающих справа и слева из грудной полости по трахее вплоть до гортани. Эта железа расположена в переднем отделе грудной полости, между I и VI ребрами на грудине. Два вилкообразных выроста зобной железы размещены по бокам трахеи. Построена железа из долек, состоящих из коркового и мозгового вещества.

У *мини-свиней* тимус очень сильно развит; в нем также различают грудную непарную и шейную парную часть, простирающуюся до гортани и даже до глотки.

У *овец* также имеется непарная грудная часть; она лежит слева и вентрально от трахеи, пищевода и передней полой вены, простираясь даже на левую поверхность сердечной сорочки. Выступающий между первыми ребрами передний конец делится приблизительно в средней трети шеи на две парные доли, достигающие краниально гортани.

У *собак* железа относительно мала и лежит в грудной полости на грудной кости в пределах от 1–6 ребра. Парные, выступающие в отдел шеи, доли незначительны, и левая из них несколько больше правой. К 2–3 годам в грудной полости от нее сохраняются лишь незначительные остатки.

Тимус у молодых *кроликов* хорошо развит. У взрослого животного паренхима железы заменяется жировой и соединительной тканями.

Тимус у морских *свинок* заходит на шею.

Вилочковая железа у *крыс, хомячков и мышей* довольно больших размеров. Расположена она под трахеей и состоит из двух долей.

Особенности дыхательной системы. Трахея *овец* состоит из 48–50 колец. В грудной полости до бифуркации трахея отдает в верхушку правого легкого особый эпартериальный бронх.

Трахея *мини-свиней* цилиндрическая и состоит из 32–36 колец. У мини-свиней трахея, как и у жвачных, отдает для верхушечной доли правого легкого эпартериальный бронх. Легкие свиньи большего объема с крупными диафрагмальными долями. Плевральная полость раздельная с двумя прочными листками средостенной плевры.

Трахея *собак* содержит более 40 колец (42–46) и формой напоминает цилиндр, лишь слегка уплощенный в дорзо-вентральном направлении. Правый и левый листки средостенной плевры собаки сращены между собой и представляют довольно тонкий подвижный листок, отделяющий обе плевральные полости, который обычно легко разрывается при вскрытии одной из плевральных полостей.

У *кошек* трахея состоит из 38—43 хрящевых колец. У *морских свинок* трахея около 3,5 см в длину, диаметром 3–5 мм. Хрящевые кольца сзади не замкнуты.

У *морских свинок* трахея состоит также из хрящевых колец, длина которых около 3,5 см, диаметр их от 3 до 5 мм.

У *крысы* трахея состоит из 30 хрящевых полуколец и выстлана двухслойным эпителием.

Легкие *мини-свиней* дольчатые: на правом легком выделяется верхушечная доля, отграниченная широкой вырезкой от сердечной доли, которая узкой и глубокой щелью отъединена от большой диафрагмальной доли. Имеется добавочная доля. Левое легкое состоит из тех же долей кроме добавочной. Легочная ткань состоит из мелких долек, разделенных прослойками соединительной ткани.

У *жвачных* легкое разделено на доли значительными надрезами. В левом легком насчитывают три доли: верхушечную, сердечную и диафрагмальную, а в правом легком кроме трех долей существует лежащая медиально добавочная доля. Весьма характерно для жвачных, что бронх для правой верхушечной доли отделяется от трахеи до ее бифуркации; сама верхушечная доля подразделяется широкой вырезкой на две лопасти, в результате чего в правом легком оказывается пять долей.

У *собак* левое легкое имеет три обычные доли: верхушечную, сердечную и диафрагмальную. В правом легком четыре доли благодаря наличию добавочной доли. Верхушечная доля этого легкого нередко раздвоена. У взрослых *собак* и *кошек* в заднем средостении существует сообщение; между правым и левым плевральными полостями через отверстие в нижнем участке средостения.

Верхушечный купол плеврального мешка *кошек*, как и у собак, справа и слева вступает в шейную область за передний край первого ребра. Особенностью строения органов грудной полости кошек является то, что у взрослых животных правая и левая плевральная полости сообщаются между собой в области заднего средостения, поэтому при вскрытии одной из полостей наступает двусторонний пневмоторакс, как и у собак.

У *кролика* легкие и дыхательная часть носовой полости по сравнению с другими животными развиты недостаточно. Правое легкое разделено на четыре доли (верхушечную, сердечную, диафрагмальную и добавочную), левое – на три (редуцированную верхушечную, сердечную и диафрагмальную). Плевральные полости правого и левого легкого у кроликов между собой не сообщаются.

У *морских свинок* правое легкое разделено на четыре доли: верхушечную, сердечную, диафрагмальную и добавочную; левое на три – верхушечную, сердечную и добавочную.

У *крыс* левое легкое состоит из одной, а правое из четырех долей: верхушечной, сердечной, диафрагмальной и добавочной.

Легкие у *хомячка* имеют такое же строение, как у крысы. Частота дыхания от 33 до 127 в минуту.

Аналогично строение легких и у *мышей*.

Особенности кардиососудистой системы. Правый желудочек сердца *кролика* большой, тонкостенный, левый несколько длиннее, имеет толстую стенку и образует верхушку сердца. Правое предсердие имеет хорошо развитое ушко и синусовую область, в которую впадают передняя и задняя полые вены. В левое предсердие впадают центральный, левопередний и правопередний коллекторные стволы легочных вен. Для кролика характерно то, что лакуны легочных вен отсутствуют, а мышечные волокна левого предсердия по стенкам легочных вен проникают в глубь легких. Такое внутрилегочное предсердие во многом благоприятствует кровообращению у животных с частым сердцебиением.

Сердце *морской свинки* четырехкамерное. Сердечный толчок слабый, разлитой. Дыхательных изменений сердечного ритма нет. Большая часть сердца покрыта долями легких. Покрывающий сердце перикад с помощью *1igamentum sternopericardiacum* соединен с грудиной.

Передней полой вены, которая у других животных возникает от слияния безымянных вен, у *крыс* нет.

Сердце *сирийского хомячка* имеет форму усеченного конуса и большей своей частью располагается в левой части грудной клетки.

Сердце *мыши* покрыто перикардом, с помощью которого фиксируется к грудине. Верхушка сердца расположена в I межреберье. На поперечном разрезе сердце слегка овальное. Ушки сердца довольно большие.

Особенности желудочно-кишечного тракта. У *жвачных* животных желудок четырехкамерный и предназначен для сбраживания клетчатки.

Особенности печени. Печень у *собак* относительно большая, с отчетливыми долями, отделенными друг от друга глубокими вырезками, состоит из 6 долей, разделенных глубокими бороздами. Особенно сильно выступают четыре доли: левые латеральная и медиальная, а также правые латеральная и медиальная. Из них наиболее объемистая левая латеральная доля. Селезенка собаки длинная, узкая и легко смещаемая. Почки расположены в краниальном отделе забрюшинного пространства, имеют бобовидную форму и также легко смещаются.

Печень у *мини-свиней* относительно больше, чем у растительноядных, но меньше, чем у хищных. Она обладает тремя вырезками и ясно распадается на четыре доли: левые латеральную и медиальную доли и правые латеральную и медиальную доли. Правая медиальная доля с желчным пузырем на висцеральной поверхности отграничивается под воротами печени от небольшой клинообразной квадратной доли, не достигающей своим вентральным заостренным концом края соседних долей. На поверхности печени заметны очень маленькие различной формы дольки, придающие органу рябоватый вид, что характерно для печени.

Поскольку в ряде экспериментов в иммунологии, вакцинологии, радиационной медицине используются *лошади* и *жеребята*, следует подчеркнуть существенные отличия в структуре печени по сравнению с дру-

гими животными. Печень лошадей лишена желчного пузыря. В ней благодаря надрезу на вентральном крае можно выделить большую правую долю, а по локализации круглой связки – левую долю, распадающуюся на левую медиальную и левую латеральную доли, в средней доле отношения остаются обычные.

Следует обратить внимание на характерное положение желчного пузыря. У *жвачных* он сильно свешивается за пределы вентрального края, у всеядных этого не отмечается; у *собак* он также не опускается, однако ввиду наличия глубоких разрезов печени желчный пузырь виден не только с висцеральной, но и с диафрагматической поверхности, чего у многих животных не бывает.

Печень всегда занимает определенное положение, а именно тотчас позади диафрагмы в подреберьях. У одних собак она лежит в левом и несколько больше в правом подреберье, тогда как желудок, наоборот, помещается несколько больше в левом подреберье. У других животных печень сильно сдвинута в правое подреберье (лошади), а желудок большее место занимает в левом подреберье. Наконец, у рогатого скота печень всецело лежит в правом подреберье, а огромный желудок передними участками занимает почти все левое подреберье.

Особенности почек. Почки у *свиней* по своему типу гладкие многососочковые. Как и у мелких жвачных, они имеют почти правильную бобовидную форму, но бывают более значительной длины и более плоские, хорошо фиксированные. Они одеты фиброзной капсулой и часто полностью окружены жировой тканью (жировая капсула). В печени свиньи различаются три доли – левая, правая и хвостатая.

Почки *мелких жвачных* (овцы и козы) сильно отличаются от таковых крупного рогатого скота. Они принадлежат к гладкому однососочковому типу с ярко выраженной бобовидной формой. Продольный разрез показывает наличие общего сосочка. Количество почечных пирамид дает основание говорить о слиянии 10–16 долек.

Почки *хищников* по строению относятся к гладкому однососочковому типу, форма их, как и у большинства млекопитающих, близко подходит к бобовидной, однако, особенно у семейства кошек, они короче и толще, чем у мелких жвачных и свиней. У хищников почки расположены под первыми тремя поясничными позвонками. Правая почка несколько заходит в правое подреберье, достигая печени. Они имеют бобовидную форму, покрыты фиброзной капсулой, окружены околопочечным жиром и почечной фасцией. Снизу прилегает брюшина так, что они лежат забрюшинно.

Экстраполяция результатов фармакологических и токсикологических исследований

Экстраполяция результатов экспериментальных данных токсикологического (фармакологического) исследования на человека представляет собой сложную, во многом нерешенную задачу, сопряженную с необходимостью учета множества факторов, требующих разработки дифференцированных алгоритмом переноса в зависимости от характера биоэффекта.

В медико-биологических исследованиях при прогнозировании токсического действия химических соединений на человека используются три вида моделей:

- ✓ лабораторные животные;
- ✓ альтернативные биологические модели (тест-системы на основе изолированных клеточных органелл, клеток, тканей);
- ✓ математические методы.

Наиболее полно принципы экстраполяции токсических и фармакологических характеристик биологически активных химических соединений разработаны на лабораторных моделях животных-млекопитающих. Используется либо прямой перенос, эволюционировавший в перенос по наиболее чувствительному виду животных с использованием корректирующих коэффициентов, либо видовой подход, базирующийся на эмпирических зависимостях с выраженными стохастическими элементами.

Биологические модели второго порядка (биотестирование) могут с большей или меньшей полнотой представлять грани отображения проявлений токсичности лишь на молекулярно-клеточном уровне. При этом для абсолютного большинства ксенобиотиков прямая экстраполяция данных с биотестов на человека невозможна в связи с отсутствием научного обоснования.

Несмотря на определенные успехи математического биомоделирования, природа межвидовых различий и сложность оценки биологической активности исключают возможность предложения универсального математического метода экстраполяции, который позволял бы сравнивать токсические (фармакологические) эффекты биологически активных химических соединений безотносительно особенностей их специфической активности на различных видах биообъектов, включая человека.

Большинство методологических подходов прогноза вероятных значений токсических (фармакологических) характеристик биологически активных химических соединений основано на предположении о принципиальном сходстве фармакологических (токсикологических) параметров биоответа, поддающихся количественной оценке и анализу в опытах на животных, и аналогичных параметров биоответа человека.

Известны примеры использования ряда анатомических, биохимических и физиологических параметров для совершенствования модельной системы оценки межвидовых различий на основе аллометрии – установлении сходства морфофункциональных характеристик и иных важнейших параметров в целях экстраполяции. В формально-логическом моделировании понятие «подобие» формулируется как подобие условий однозначности при тождественности основной системы уравнений. В медицинской биологии при характеристике критериев подобия явлений общепризнанным является выделение подобия биологических констант, начальных (и граничных) условий, функций (и эффектов), условий пространственно-временного подобия. То есть, говоря о подобии, подразумевается комплекс из пяти критериев, отображающих:

критерий 1 – пространственное сходство (или общность) морфофункциональных характеристик органов и систем у прототипа человека и его биологической модели;

критерий 2 – единство (или сходство) метаболических, нейрорегуляторных, двигательных, эндокринных и экзокринных функций;

критерий 3 – единство (или максимальное сходство) эффектов критических систем и органов по их реагированию на исследуемое воздействие;

критерий 4 – сопоставимость констант (или иных параметров), количественно оцениваемых и математически описываемых в системе гомогенных функций у прототипа;

критерий 5 – временное подобие.

Экстраполяция возможна (и производится) только на основе экспериментального материала, полученного на тех видах животных, на которых воспроизводятся типичные проявления биоэффекта, инициируемые исследуемым веществом.

Подходы к экстраполяции экспериментальных данных, характеризующих проявления токсичности, различаются в зависимости от механизма действия и специфики биологической активности химических соединений, в частности: возможности проявления их эффектов за счет общих метаболических изменений или за счет лиганд-рецепторного взаимодействия.

Прогноз вероятных эффективных доз образцов биологически активных химических соединений, механизм действия которых сопряжен с изменением универсальных для всех тканей процессов обмена веществ, применительно к человеку, производят с использованием коэффициентов межвидового пересчета.

Эти коэффициенты получают на основе математических уравнений связывающих протекающие во времени биологические реакции организма с массой тела. Константы подобия показывают, во сколько раз быстрее (или медленнее) может развиться интоксикация у животного по сравнению с человекам из-за большей (или меньшей) интенсивности биологических процессов и составляют, по нашим расчетам, если *человека принять за единицу*: для мыши ~9,7 , крысы ~5,2, морской свинки ~4,3, кролика ~2,5, собаки ~1,7, овцы ~1,4, свиньи ~0,83 и лошади ~0,75. При переходе на реальное время это означает, что, например, интоксикация или побочная реакция лекарств, развивающаяся у крысы за 3 месяца, проявится у мыши уже через 1,5 месяца, у кролика – через 6 месяцев, собаки – через 1 месяц, человека – 16 месяцев, а у лошади – только через 22 месяца воздействия вещества. Существование аллометрических зависимостей времени для развития эффектов интоксикации необходимо принимать во внимание, оценивая достаточность длительности фармакологических и токсикологических опытов при экстраполяции данных с животных на человека. Такой перенос рекомендован Минздравом России к использованию в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2005 г.

Американское агентство по защите окружающей среды рекомендует для переноса токсикометрических данных с крыс на человека использовать следующее уравнение:

$$Доза_{чел} = доза_{крыса} \times \left(\frac{m_{чел}}{mT_{крыса}} \right)^{0,667} .$$

Модификация этого метода предполагает использование не только массы тела (m), но и массы внутренних органов, органов-мишеней, различных физиологических показателей, закономерно изменяющихся при переходе от более мелких к более крупным животным.

В случае химических соединений с рецепторным или смешанным механизмом действия прогнозирование вероятных эффективных доз на человека осуществляется способами, базирующимися на:

- ✓ видовых особенностях эффективности подобного препарата (вещества сравнения);
- ✓ данных распределения вещества в эффект-компартменте и особенностях проявления биоэффекта химического соединения.

Прогнозирование вероятных эффективных доз по известным уровням активности препаратов сравнения (одинаковых фармакологических групп) производится с использованием группового коэффициента переноса доз на человека с лабораторного животного. Задача экстраполяции сводится к поиску соответствия между активностью известных представителей фармакологической группы у экспериментальных животных и человека, определению наиболее и наименее чувствительного вида жи-

вотных по развитию целевого эффекта, определению вида экспериментальных животных, наиболее близко стоящего к человеку по фармакологическим и токсикометрическим параметрам исследуемого биологически активного химического соединения.

Прогнозирование эффективных доз по характеристикам распределения химического соединения в эффект-компартменте и проявлениям биоэффекта осуществляется на основании анализа фармако-кинетических и биометрических показателей, а также уровня функциональной активности органов и систем.

При прогнозировании, основанном на выявлении корреляционных связей между эффективными дозами и анатомо-физиологическими характеристиками эффект-компартмента лабораторных животных различных видов, используют, как правило, линейную математическую зависимость:

$$\log D = a + b \times \log Y,$$

где D – эффективная доза исследуемого вещества; Y – анатомо-физиологический или биохимический показатель (масса эффект-органа или ткани, плотность рецепторов, функциональные или биохимические характеристики различных систем организма, а также иные показатели и их соотношения). В случае, когда совокупность экспериментальных данных не позволяет получить тесную корреляционную зависимость ($R^2 \leq 0{,}7$), рассматриваемый методический подход прогнозирования отклоняется.

При прогнозировании вероятной токсичности на основе фармакокинетических показателей определяют концентрацию препарата в биотканях с учетом концентрационных и временных характеристик распределения.

При прогнозировании используют, как правило, логарифмическую ($\log E = \log a + b \times \log D$) или степенную ($E = a \times D^b$) зависимости «доза–эффект», в которых в качестве показателя биоэффекта выступает фармакокинетический параметр. Прогнозирование вероятной токсичности на основе фармако-кинетических показателей представляет собой наиболее сложный (но и наиболее точный) вариант экстраполяции.

В качестве универсального методологического подхода экстраполяции экспериментальных данных с животных на человека активно развивается расчетный метод, основанный на общебиологической закономерности, свойственной высшим животным: логарифмы биологических параметров млекопитающих находятся в линейной корреляционной связи с логарифмами массы тела и, как правило, выражаются параболической функцией вида $X = aY^b$, или уравнением прямой общего вида $\lg X = \lg a + b \lg Y$. В общей сложности логарифмическая линейная связь биологических параметров с массой тела установлена более чем для ста

самых различных биохимических, физиологических и морфологических констант млекопитающих. Частным случаем «правила веса тела» является линейная корреляционная связь показателей токсичности химических веществ для различных видов биообъектов с их массой.

Данный методологический подход был использован для обработки информации о показателях острой токсичности применительно к человеку и 4–6 видам лабораторных животных более чем для 100 химических соединений. Использование уравнений регрессии для расчёта значений биологических параметров у человека по результатам, полученным на лабораторных животных, показало, что теоретические и экспериментальные значения различались в ~1,2–1,5 раза, а максимальные пределы расхождения для отдельных веществ не превышали 2,0–2,5 раза. Однако для ряда показателей, отнесенных в дальнейшем к «социально обусловленным» (продолжительность жизни человека, относительный вес головного мозга, количество потребляемого головным мозгом кислорода), экстраполяция с использованием уравнения регрессии оказалась невозможной.

На основе аллометрического соотношения между массой тела различных биообъектов и биологическим временем проявления токсоэффекта разработан методологический подход и адаптированы методики ориентировочной оценки быстродействия биологически активных химических соединений для человека. Теоретической основой данного подхода является констатация того, что:

- ✓ по мере увеличения размеров тела биообъекта прогрессивно снижаются скорости метаболизма на единицу массы тела: скорость метаболизма (M) биообъекта пропорциональна весу его тела (B) в степени 0,75: $M = \acute{\alpha} B^{0,75}$, где $\acute{\alpha}$ – константа в соответствующих единицах;
- ✓ величины, характеризующие те или иные виды физиологического времени (минутный объем дыхания, время кругооборота крови и др.), вариабельны в зависимости от видовой принадлежности млекопитающих и находятся в зависимости от веса тела: $\tau = \acute{\alpha} B^{0,28}$, где $\acute{\alpha}$ – константа в соответствующих единицах;
- ✓ на всех уровнях биологической организации наблюдаемое онтогенетическое и филогенетическое увеличение размеров тела непосредственно связано с возрастанием продолжительности всех периодических явлений, общая особенность которых может быть сформулирована с помощью степенной функции для биологического времени: $\tau_{биол.} = \acute{\alpha} W^{0,27}$, где W – хронологическое время, $\acute{\alpha}$ – константа в соответствующих единицах.

Математические уравнения, связывающие протекающие во времени биологические реакции организма с массой тела, дают возможность рассчитать коэффициенты или константы подобия относительных скоростей

этих реакций для лабораторных животных и человека. Константы подобия показывают, во сколько раз быстрее (или медленнее) развивается интоксикация у лабораторного животного по сравнению с человеком из-за большей (или меньшей) интенсивности биологических процессов.

Метод ориентировочной оценки быстродействия для человека на основе аллометрических соотношений между массой тела различных биообъектов и биологическим временем проявления токсоэффекта включает:

- ✓ определение на 5 и более видах лабораторных животных среднего хронологического эффекта, обусловленного воздействием эквитоксичных доз;
- ✓ преобразование хронологического времени в межвидовое биологическое посредством соответствующих коэффициентов пересчета, характеризующих количество циклических физиологических процессов, совершаемых каждым видом животных в единицу хронологического времени;
- ✓ построение математической модели, основанной на аллометрических связях между параметрами биологического временного эффекта и массой тела рассматриваемых биообъектов (преобразованные параметры быстродействия подвергаются статистической обработке с помощью метода линейной регрессии; определяется наличие корреляционных связей между параметрами среднего биологического времени и массой биообъекта, которая является аллометрическим уравнением типа $Y= aM^b$).

Современное состояние проблемы прогноза токсичности ксенобиотиков характеризуется продолжением поиска интегральных показателей, отражающих межвидовые различия в чувствительности к токсикантам, детализацией по их связи с параметрами систем, ответственных за метаболизм ксенобиотиков и взаимодействия с биомишенью.

Адекватность и валидность альтернативных моделей

Пределы допустимости использования альтернативной модели в отношении прототипа, проверка степени соответствия и адекватности должны быть выполнены с особой тщательностью.

Основной аргумент, используемый при обосновании возможности экстраполяции данных биотестирования на человека – это высокая чувствительность биотест-объектов к токсичным веществам.

Однако для основной же массы веществ и лекарств прямая экстраполяция данных с биотестов на человека невозможна. В случаях использования альтернативных моделей необходимо приводить стандартные уровни реагирования тест-объектов на индивидуальные вещества, для

того чтобы исследователи могли ориентироваться в допустимости прямой экстраполяции на человека полученных при биотестировании результатов. Это тем более важно, что даже у лабораторных животных-биомоделей имеются большие различия в относительном потреблении воды, а значит, и делюции лекарственных препаратов и ксенобиотиков.

Касаясь применимости понятий аллометрии к альтернативным моделям, не следует делать излишне категоричные суждения. По-видимому, нет ограничений для них в соответствии с четвертым и третьим критериями подобия, если это касается переноса экспериментальных данных в отношении клеточных элементов и их пулов у человека. Речь, естественно, идет об альтернативных моделях, выполненных на переживающих клетках и одноклеточных организмах. В то же время трудно даже представить любое построение в виде биологической модели, в которой мы смогли бы проигнорировать пятое подобие, т.е. *временной вектор модели*.

Одновременно с уже ставшими классическими принципами биомоделирования Russel и Burch предложили для достижения наибольшей ясности новую терминологию *альтернативного моделирования*:

частичное замещение – когда альтернативный метод частично замещает эксперимент на животных и требует дополнительной альтернативной методики без животных, что является частью общей стратегии или последовательности проведения или полного замещения тестов с использованием животных;

батарея тестов (test battery) – серия тестов, выполненных в одно и то же время или в тесной связи друг с другом. Каждый тест внутри последовательности строится для получения дополнительной информации от предыдущего, а также для измерения различий дополнительного многофакторного токсического эффекта;

стратегия последовательных тестов (tiered test strategy) – тесты проводятся в строгой последовательности, а выбор каждого определяется достоверными результатами предыдущего уровня исследований. Это последовательный процесс в виде серии тестов, проводимых в определенном порядке и приводящий к искомому результату.

Количество альтернативных методов в настоящее время ограничено для практического применения. Наиболее приемлемые альтернативы применяются либо в токсикологических областях, либо для оценки безопасности лекарств и ксенобиотиков. Для большинства областей фармакологии и токсикологии, наиболее значимых и имеющих ключевое значение, *валидные* (лицензированные) альтернативные тесты отсутствуют.

В продвижении новых методов тестирования, определенных ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods – Европейский центр по валидации альтернативных методов), существуют 5 ступеней:

разработка теста; предварительное обоснование; официальное обоснование; независимая оценка специалистов; ввод в регулярное использование.

Шагая по этим «ступеням», эксперты определяют валидность метода тестирования и дают оценку токсикологической области релевантности в лекарственной безопасности. Получение валидной квалифицированной методики оценивается в соответствии с выделенными шагами процесса, сроками выполнения, материально-техническими, экономическими затратами, квалификацией персонала, а главное, соблюдением *требований экстраполяции* и *принципов подобия* биомодели в отношении прототипа–человека.

Оппоненты использования животных в опытах считают, что такие исследования имеют 50% вероятность. Этот уровень говорит о том, что гипотеза, подтвержденная на модели и проверенная там, не работает на объекте. Статистически гипотеза на объекте меньше 0,05, даже если на модели она была подтверждена. 50% уровень вероятности должен быть сравнен и проверен *не на животных-моделях,* которые служили для выработки гипотезы, а в клинических наблюдениях. Если другие пути проверки гипотезы дадут 25% норму вероятности, то *животные-модели являются более эффективным путем* для генерирования гипотезы.

Contents